



**Mechanismen zur Steuerung transkriptioneller
Programme für Wachstum und Differenzierung
durch den TEA-Regulator Tec1
in *Saccharomyces cerevisiae***

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität
vorgelegt von

Julia van der Felden
aus Marburg

Marburg/Lahn 2012

Die vorliegende Arbeit wurde von Dezember 2008 bis Juni 2012 in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch am Fachbereich Biologie im Fachgebiet Genetik der Philipps-Universität Marburg angefertigt.

Vom Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation
angenommen am: _____

Erstgutachter: Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch
Zweitgutachter: Prof. Dr. Erhard Bremer

Tag der mündlichen Prüfung am: _____

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Heise, B., van der Felden, J., Kern, S., Malcher, M., Brückner, S., and Mösch, H.-U. (2010). The TEA transcription factor Tec1 confers promoter-specific gene regulation by Ste12-dependent and -independent mechanisms. *Eukaryot Cell* **9**, 514–531

Eingereicht:

van der Felden, J., Weisser, S., Brückner, S., Lenz, P., and Mösch, H.-U. (2012). The TEA transcription factor Tec1 interacts with co-regulators Msa1 and Msa2 to control yeast cell size and development.

In Vorbereitung:

van der Felden, J., Weisser, S., Bandmann, K., Lenz, P., and Mösch, H.-U. (2013). Signal processing dynamics of MAPK modules.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation „Mechanismen zur Steuerung transkriptioneller Programme für Wachstum und Differenzierung durch den TEA-Regulator Tec1 in *Saccharomyces cerevisiae*“ selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich angegebenen Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Ort, Datum)

(Julia van der Felden)

Abkürzungen und Fachbegriffe

Für Maßeinheiten wurde das Internationale Einheitensystem (SI; *Système international d'unités*) und die davon abgeleiteten Einheiten verwendet. Aminosäuren wurden mit dem Ein-Buchstaben-Code der Nomenklatur der „International Union of Biochemistry and Molecular Biology“ abgekürzt. Akronyme und Abkürzungen sind im Text an entsprechender Stelle erläutert, wenn sie für das weitere Verständnis notwendig sind.

%	Prozent	N-Terminus	Aminoterminus
°C	Grad Celsius	OD	optische Dichte
Abb.	Abbildung	o-NPG	ortho-Nitrophenyl-Galaktopyranosid
<i>Amp^R</i>	Ampicillin-Resistenz	ORF	" <u>o</u> pen <u>r</u> eadin <u>g</u> <u>f</u> ra <u>m</u> e"
APS	Ammoniumpersulfat	P	Promotor
ATP	Adenosintriphosphat	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
bp	Basenpaare	PCR	" <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> ea <u>ct</u> ion"
BSA	bovines Serumalbumin	PEG	Polyethylenglykol
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat	pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
CFP	Cyan fluoreszierendes Protein	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
cRNA	"copy RNA"	Primer	Oligonukleotid
C-Terminus	Carboxyterminus	ProA	Protein A
dH ₂ O	entsalztes Wasser	RFP	rotfluoreszierendes Protein
DIC	" <u>d</u> ifferential <u>i</u> nterference <u>c</u> on <u>tr</u> ast"	RNA	Ribonucleinsäure
DNA	Desoxyribonucleinsäure	RNase	Ribonuklease
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat	rpm	"rotations per minute"
DTT	Dithiothreitol	RT	Raumtemperatur
ECL	" <u>e</u> nhanced <u>c</u> hemol <u>u</u> minescence"	s	Sekunde
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat	SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>et al.</i>	und andere	SORB	Sorbitol
EtOH	Ethanol	T	Terminator
f	femto	Tab.	Tabelle
GO	"gene ontology", standardisierte Beschreibung von Gen- und Genprodukt-Eigenschaften	TAE	Tris-Acetate-EDTA
GST	Glutathion-S-Transferase	Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
GTP	Guanidin-Triphosphat	TBS	" <u>T</u> ris- <u>b</u> uffered <u>s</u> aline"
HCl	Hydrochlorid	TE	Tris-EDTA
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
<i>HphNT1</i>	Hygromycin-B-Resistenz	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
IgG	Immunglobulin G	Tween	Polyoxyethylen-Sorbitanmonolaurat
l	Liter	UAS	" <u>u</u> pstream <u>a</u> ctiva <u>t</u> ion <u>s</u> eque <u>n</u> ce"
kb	Kilobasen	Ubi	Ubiquitin
KOH	Kaliumhydroxid	URS	" <u>u</u> pstream <u>r</u> epression <u>s</u> eque <u>n</u> ce"
m	milli	UV	Ultraviolett
M	Mol, Stoffmengeneinheit	v/v	"volume per volume"
MAPK	" <u>m</u> itogen <u>a</u> ctivated protein <u>k</u> inase"	V	Volt
MAT	" <u>m</u> ating type locus"	Vol	Volumen
m	Meter	w/v	"weight per volume"
min	Minute	YFP	" <u>y</u> ellow <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein"
mRNA	"messenger RNA"	α	<i>alpha</i>
n	nano	β	<i>beta</i>
<i>NatNT2</i>	Nourseothricin-Resistenz	γ	<i>gamma</i>
		Δ	<i>delta</i> (Deletion eines Gens)
		λ	<i>lambda</i> (Wellenlänge des Lichts)
		μ	<i>micro</i>
		Ø	Durchmesser

Zusammenfassung

Die Koordination von Wachstum und Differenzierung als Antwort auf verschiedene Signale und Umweltbedingungen ist eine grundlegende Eigenschaft von Organismen. Hierbei erfordern die Anpassung von Zellteilungszyklus und Stoffwechsel und morphologische Änderungen eine spezifische Regulation der Genexpression mit Hilfe von Transkriptionsfaktoren. Eine zentrale Frage ist, welche Kombinationen von Transkriptionsfaktoren an welchen Promotoren bei der Regulation von Wachstum und Differenzierung überhaupt eine Rolle spielen.

In der vorliegenden Arbeit wurde exemplarisch die kombinatorische und promotorspezifische Kontrolle des TEA-Transkriptionsfaktors Tec1 aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* untersucht. Tec1 ist zusammen mit dem Transkriptionsfaktor Ste12 an der Regulation der Differenzierungsprogramme Biofilmbildung und Konjugation beteiligt und wird unter anderem über den Fus3/Kss1-MAPK-Signalweg gesteuert. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Komplexbildung von Tec1 und Ste12 analysiert. Es stellte sich heraus, dass Tec1-Zielgene in eine Ste12-abhängig und in eine Ste12-unabhängig regulierte Klasse eingeteilt werden können. Ste12 kann die Stabilität von Tec1 über dessen C-terminale Domäne regulieren, die zudem eine Ste12-unabhängige Transkriptionsaktivierungsdomäne enthält.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Co-Regulatoren Msa1 und Msa2 als neue Interaktionspartner von Tec1 identifiziert. Tec1, Msa1 und Msa2 regulieren gemeinsam zelluläre Differenzierungsprogramme wie Biofilmbildung und Konjugation. Zudem wirken sie auf den Zellteilungszyklus und die Ribosomensynthese. Dies sind Prozesse, die das Wachstum und die Zellgröße beeinflussen. Tec1, Ste12, Msa1 und Msa2 können verschiedene Komplexe ausbilden und in unterschiedlichen Kombinationen an gemeinsam regulierte Promotoren binden.

Der dritte Teil dieser Arbeit beschreibt den Aufbau und die Validierung eines Messsystems, mit dessen Hilfe man in lebenden Zellen die Signaltransduktionsdynamik im Fus3/Kss1-MAPK-Modul unter verschiedenen Bedingungen quantitativ messen kann. Dies geschieht durch Bestimmung von Menge, Lokalisierung und programm-spezifischer Aktivität der Regulatoren Tec1, Ste12, Dig1 und Dig2 mittels Fluoreszenzmikroskopie.

Summary

The coordination of cellular growth and differentiation in response to internal and external signals is an elementary feature of all organisms. Adaptation of cell division cycle, metabolism and morphological alterations require a specific regulation of gene expression executed by transcription factors. In many cases, it is not known which transcription factors are located at target promoters during control of growth and division. Using the paradigm of combinatorial and promoter-specific control of the TEA-family transcription factor Tec1 from the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*, this work targets to answer this question. Tec1 is controlled by the Fus3/Kss1 MAPK signaling pathway and regulates the cellular differentiation programs biofilm formation and conjugation together with the transcription factor Ste12.

In the first part of this work, the Tec1-Ste12 complex formation was investigated in detail. The results show that Ste12-dependent and Ste12-independent Tec1 target genes can be divided into different classes. Moreover, Ste12 controls Tec1 protein stability via the Tec1-C-terminus by which Tec1 is also able to activate Ste12-independent target gene expression.

In the second part of this work, two novel interaction partners of Tec1, the co-regulators Msa1 and Msa2 were identified. Tec1, Msa1 and Msa2 co-regulate the differentiation programs biofilm formation and conjugation. Moreover, these proteins control cellular growth and correspondingly cell size by affecting cell cycle and ribosome biogenesis. Tec1, Ste12, Msa1 and Msa2 can form several distinct complexes that bind to promoters of co-regulated genes.

In the third part, an *in vivo* system for quantitative analysis of Fus3/Kss1 MAPK signaling dynamics was established and validated under different conditions. With this system the concentration, localization and program-specific activity of the regulators Tec1, Ste12, Dig1 and Dig2 can be determined by fluorescence microscopy.

Inhaltsverzeichnis

Erklärung	I
Abkürzungen und Fachbegriffe	II
Zusammenfassung	III
Summary	IV
Inhaltsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> als Modellorganismus	1
1.2 Der Lebenszyklus von <i>S. cerevisiae</i>	1
1.3 Wachstum und Differenzierung in <i>S. cerevisiae</i>	4
1.3.1 Die Differenzierungsprogramme Konjugation und Biofilmbildung	5
1.3.1.1 Das Fus3/Kss1-MAPK-Modul	6
1.3.1.2 Der Ras/PKA-Signalweg	9
1.3.1.3 Der TOR-Signalweg	10
1.3.1.4 Die generelle Aminosäurekontrolle	11
1.3.2 Der Zellzyklus in <i>S. cerevisiae</i>	11
1.3.2.1 Die Regulation von <i>TEC1</i> im Zellzyklus	14
1.3.2.2 Die Co-Regulatoren Msa1 und Msa2	14
1.3.3 Die Regulation der Zellgröße	16
1.3.3.1 Die Regulation der Ribosomenbiogenese	18
1.4 Die Transkriptionsfaktoren Tec1 und Ste12	19
1.4.1 Die Familie der TEA-Transkriptionsfaktoren	19
1.4.1.1 Die Domänenstruktur von Tec1	22
1.4.2 Der Transkriptionsfaktor Ste12	23
1.4.2.1 Die Domänenstruktur von Ste12	23
1.4.3 Mechanismen der Tec1-Ste12-Zielgenkontrolle	24
1.5 Ziele dieser Arbeit	27
2 Ergebnisse	28
2.1 Tec1 vermittelt promotor-spezifische Genregulation durch Ste12-abhängige und Ste12-unabhängige Mechanismen	28
2.1.1 Tec1 aktiviert Ste12-unabhängig TCS-vermittelte Genexpression und <i>FLO11</i> -vermittelte Biofilmbildung	28
2.1.2 Die C-terminale Domäne von Tec1 vermittelt Ste12-unabhängige Transkriptionsaktivierung	30
2.1.3 Die C-terminale Domäne von Tec1 kann durch eine Aktivierungsdomäne von Ste12 ersetzt werden	32
2.1.4 Ste12-abhängige und Ste12-unabhängige Zielgene von Tec1 lassen sich in zwei Klassen einteilen	35
2.1.5 Ste12 kontrolliert die Stabilität von Tec1 über dessen C-terminale Domäne	37

2.2 Tec1 interagiert mit den Co-Aktivatoren Msa1 und Msa2 zur Kontrolle von Zellgröße und Differenzierung	39
2.2.1 Tec1 interagiert mit Msa1 und Msa2	39
2.2.2 Msa1 und Msa2 beeinflussen die Tec1-vermittelte Genexpression	41
2.2.3 Tec1 ist ein positiver Regulator der Zellgröße, während Msa1 und Msa2 die Zellgröße negativ regulieren	45
2.2.4 Tec1, Msa1 und Msa2 können Gene für Aminosäurebiosynthese, Konjugation und Ribosomenproduktion gemeinsam regulieren	48
2.2.5 Tec1, Ste12, Msa1 und Msa2 können verschiedene Komplexe ausbilden	52
2.2.6 Tec1, Ste12, Msa1 und Msa2 binden in unterschiedlichen Kombinationen an gemeinsam regulierte Promotoren	55
2.2.7 Die C-terminale Domäne von Tec1 lässt sich nicht vollständig durch Msa1 oder Msa2 ersetzen	59
2.3 <i>In-vivo</i> -Analyse der Signaltransduktionsdynamik im Fus3/Kss1-MAPK-Modul	64
2.3.1 Aufbau eines Systems zur quantitativen Analyse der Signaltransduktion im Fus3/Kss1-MAPK-Modul	64
2.3.1.1 Endogene Markierung von Tec1, Ste12, Dig1 und Dig2 mit YFP und RFP	64
2.3.1.2 Konstruktion und Überprüfung von programmspezifischen transkriptionellen CFP-Reportergenen	65
2.3.1.3 RFP- und YFP-Reportergene eignen sich nicht für die Analyse der Dynamik programmspezifischer Transkriptionsaktivierung	69
2.3.2 Untersuchung der Signaltransduktionsdynamik des Fus3/Kss1-MAPK-Moduls unter vegetativen und unter Konjugationsbedingungen	72
2.3.2.1 Regulation von Tec1, Ste12, Dig1 und Dig2 und programmspezifischer Reportergene durch Pheromon	72
2.3.2.2 Charakterisierung von <i>tec1Δ</i> -, <i>ste7Δ</i> - und <i>bar1Δ</i> -Stämmen unter vegetativen und unter Konjugationsbedingungen	75
2.3.2.3 Untersuchung einer YFP-markierten, stabilen Tec1-Variante unter vegetativen und unter Konjugationsbedingungen	78
3 Diskussion	80
3.1 Kombinatorische und promotorspezifische Kontrolle von Tec1, Ste12, Msa1 und Msa2	80
3.2 Tec1, Ste12, Msa1 und Msa2 können verschiedene Komplexe ausbilden	81
3.2.1 Die Komplexbildung zwischen Tec1 und Ste12	81
3.2.2 Die Komplexbildung zwischen Tec1, Ste12, Msa1 und Msa2	84
3.3 Die Regulation transkriptioneller Programme zur Kontrolle von Wachstum und Differenzierung in <i>S. cerevisiae</i>	86
3.3.1 Die Regulation von Tec1-Zielgenen durch Ste12-abhängige Mechanismen	86
3.3.2 Die Regulation von Tec1-Zielgenen durch Ste12-unabhängige Mechanismen	87
3.3.3 Die Regulation der Biofilmbildung durch Tec1, Ste12, Msa1 und Msa2	88
3.3.4 Die Regulation der Konjugation durch Tec1, Ste12, Msa1 und Msa2	92

3.3.5 Die Regulation der Zellgröße	94
3.3.5.1 Die Regulation der Zellgröße durch Tec1	94
3.3.5.2 Die Regulation der Zellgröße durch Msa1 und Msa2	96
3.3.6 Funktionelle Interaktionen zwischen Msa1 und Msa2	98
3.3.7 <i>In-vivo</i> -Analyse der Signaltransduktionsdynamik im Fus3/Kss1-MAPK-Modul	101
3.4 TEA-Transkriptionsfaktoren als Integrationsplattformen für die Regulation von Wachstum und Differenzierung	102
4 Material	105
4.1 Geräte	105
4.2 Chemikalien	106
4.3 Enzyme, Größenstandards und Kits	106
4.4 Auftragsarbeiten	107
4.5 Nährmedien	107
4.6 Antibiotika	108
4.7 Antikörper	109
4.8 Polyacrylamid-Gele	109
4.9 Stämme und Plasmide	110
4.9.1 <i>E. coli</i> -Stämme	110
4.9.2 <i>S. cerevisiae</i> -Stämme	110
4.9.3 Plasmide	118
4.10 Oligonukleotide	123
5 Methoden	128
5.1 Kultivierung von Mikroorganismen	128
5.1.1 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	128
5.1.2 Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	128
5.2 Isolierung von DNA	128
5.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	128
5.2.2 Isolierung von genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	129
5.2.3 Isolierung von Plasmiden aus <i>S. cerevisiae</i>	130
5.3 Klonierungstechniken und Mutagenese von DNA	130
5.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	130
5.3.2 Sequenzspezifische Mutagenese	130
5.3.3 Restriktion von DNA	131
5.3.4 Gelelektrophorese von DNA in Agarosegelen	131
5.3.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	131
5.3.6 Dephosphorylierung von DNA	132
5.3.7 Ligation von DNA	132
5.3.8 "Drag and Drop cloning"	132
5.3.9 Fällung von DNA mit Ethanol	132

5.4 Transformationsmethoden	133
5.4.1 Transformation von <i>E. coli</i>	133
5.4.1.1 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	133
5.4.1.2 Transformation von <i>E. coli</i>	133
5.4.2 Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	133
5.5 Analyse von DNA	134
5.5.1 Nachweis von DNA: "Southern-Hybridisierung"	134
5.5.2 Sequenzierung von DNA	135
5.6 Analyse von RNA	135
5.6.1 Isolierung von RNA aus <i>S. cerevisiae</i>	135
5.6.2 Quantitative Realtime-PCR mit "iQ TM SYBR [®] Green Supermix"	136
5.6.3 RNA-Microarray-Analyse nach dem "GeneChip [®] Expression Analysis Technical Manual"	136
5.7 Analyse von Proteinen	137
5.7.1 Herstellung von Proteinextrakten aus <i>S. cerevisiae</i> : „Alkalische Lyse“	137
5.7.2 Co-Affinitätsreinigung von GST-markierten Proteinen und assoziierten Proteinen	138
5.7.3 Co-Immunopräzipitation von Protein-A-markierten Proteinen und assoziierten Proteinen	138
5.7.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	139
5.7.5 „Western Blot“	139
5.7.6 Photometrischer β -Galaktosidasetest	140
5.7.7 Bestimmung der Proteinkonzentration	141
5.8 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)	141
5.8.1 Herstellung von mit Formaldehyd kreuzvernetzten Chromatinextrakten aus <i>S. cerevisiae</i>	141
5.8.2 Immunopräzipitation	143
5.8.3 Reinigung immunopräzipitierter DNA-Fragmente	143
5.8.4 PCR	144
5.9 Quantitative Fluoreszenzmikroskopie	144
5.9.1 Fluoreszenzmikroskopie	144
5.9.2 Quantifizierung der Mikroskopie-Bilder mit "ImageJ"	145
5.10 Analyse von <i>S. cerevisiae</i>	146
5.10.1 Waschtest zur Bestimmung des adhäsiven Wachstums auf Agar	146
5.10.2 Adhäsionstest an Polystyrol	146
5.10.3 Qualitativer Paarungstest	147
5.10.4 Bestimmung der Zellgröße mit dem "Multisizer TM 3" Partikelanalysegerät	147
6 Literaturverzeichnis	148
7 Lebenslauf	165
8 Danksagungen	166
Anhang: Tabelle A1	167

1 Einleitung

1.1 *Saccharomyces cerevisiae* als Modellorganismus

Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* ist ein eukaryotischer Mikroorganismus und ist als Modellorganismus für die Erforschung von nahezu allen molekularbiologischen und zellbiologischen Prozessen bestens geeignet. Systematisch gehört *S. cerevisiae* ins Reich der Pilze, zur Klasse der *Saccharomycetes* (Zuckerhefen). Die lateinische Bezeichnung "*cerevisiae*" bedeutet "des Bieres". Seit über 6000 Jahren nutzt der Mensch die Eigenschaft der Bäckerhefe, Zucker zu Alkohol vergären zu können, zur Herstellung von Backwaren, Bier und Wein. *S. cerevisiae* hat sich außerdem zu einem beliebten Modellorganismus entwickelt, da sie leicht und kostengünstig zu kultivieren ist, eine kurze Verdopplungszeit von etwa 90 min hat und genetisch einfach zu manipulieren ist. Nachdem zu Beginn des letzten Jahrhunderts zunächst metabolische Prozesse mit Hilfe der Bäckerhefe untersucht wurden, wurden bald weitere grundlegende Fragestellungen erforscht, wie die der sexuellen Fortpflanzung, der Regulation des Zellteilungszyklus oder der Replikation und Rekombination von DNA. 1996 wurde das Genom von *S. cerevisiae* vollständig sequenziert (Goffeau *et al.*, 1996), und die Untersuchung von Interaktionsnetzwerken von Genen und Proteinen und evolutionäre Aspekte rückten in den Fokus der Forschung (Botstein & Fink, 2011). Auch medizinische Fragen können mit dem Modellsystem *S. cerevisiae* beantwortet werden, da rund 30 % der Gene, die an menschlichen Krankheiten beteiligt sind, Orthologe in der Hefe besitzen (Foury, 1997). Die Bäckerhefe findet auch industrielle Anwendung bei der Herstellung von Aminosäuren, Enzymen, Insulin oder Artemisinin, einem Wirkstoff gegen Malaria (Zeng *et al.*, 2008).

1.2 Der Lebenszyklus von *S. cerevisiae*

S. cerevisiae kann sowohl in haploider, als auch in diploider Form vorkommen (Abb. 1.1). Haploide und diploide Hefezellen vermehren sich bei guten Nährstoffbedingungen durch asexuelle Sprossung. Dabei produziert eine Mutterzelle durch mitotische Zellteilung einen Spross, der sich durch Abschnürung löst und so zur

Tochterzelle wird. An der Stelle, an der sich die Tochterzelle ablöst, entsteht eine Narbe, an welcher kein neuer Spross mehr entstehen kann. Das Sprossungsmuster von haploiden Hefezellen ist axial, die Sprossung findet hier nahe der alten Geburtsnarbe der Mutterzelle statt (Freifelder, 1960).

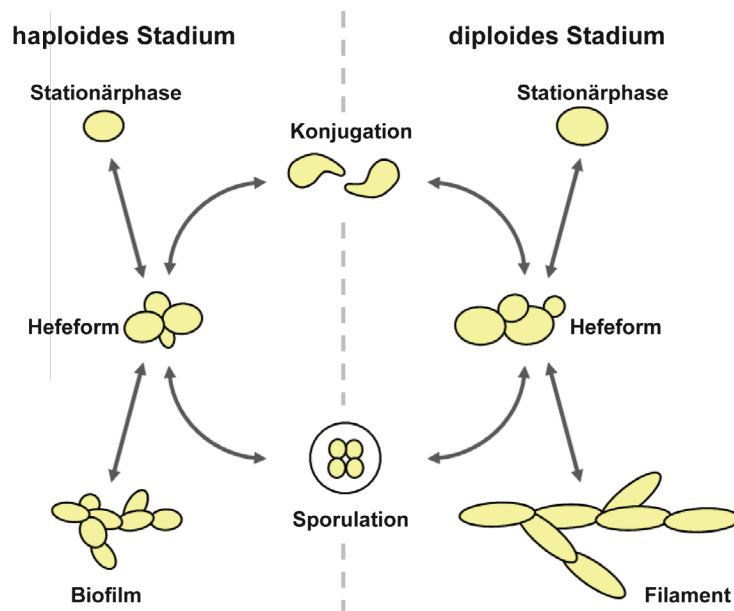


Abb. 1.1: Der Lebenszyklus von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* ist ein dimorpher Ascomycet, der sich im haploiden und diploiden Stadium vegetativ durch Sprossung vermehren kann. Der Übergang vom haploiden in ein diploides Stadium erfolgt durch Konjugation. Abhängig vom Nährstoffangebot kann *S. cerevisiae* multizelluläre Differenzierungsformen wie Biofilme oder Filamente ausbilden, in die Stationärphase übergehen oder die Sporulation einleiten.

Haploide *S. cerevisiae*-Zellen kommen in zwei unterschiedlichen Paarungstypen, *MATa* und *MATα*, vor, die sich durch ein Pheromon-basiertes Signalsystem erkennen können. Durch sexuelle Zellfusion und Karyogamie entsteht bei der Konjugation eine diploide *MATa/α*-Zelle. Der genetische Austausch bei der Konjugation erhöht die genetische Variabilität von Hefezellpopulationen. Die Sprossung diploider Hefezellen erfolgt bipolar (Freifelder, 1960). Haploide Wildisolate der Bäckerhefe können einen Wechsel des Paarungstyps durchlaufen. Dabei wird der aktive Paarungstyplokus gegen eine vormals inaktive *MAT*-Kopie getauscht. Dies dient dazu, Teile einer bis dahin eingeschlechtlichen Population zur Konjugation zu befähigen (Sprague *et al.*, 1983).

Als Reaktion auf externe oder interne Signale kann *S. cerevisiae* unterschiedliche Differenzierungsprozesse durchlaufen (Abb. 1.1) (Zaman *et al.*, 2008). Ist beispielsweise nur eine nicht-fermentierbare Kohlenstoffquelle wie Acetat vorhanden und herrscht gleichzeitig Stickstoff- und Glucosemangel, wird bei diploiden Hefezellen die Sporulation eingeleitet. Bei der Sporulation bildet die Hefezelle durch Meiose vier

haploide Sporen aus. Die vier Sporen, die eine Tetrade bilden, sind umgeben von der Zellwand der ehemaligen Mutterzelle, dies bezeichnet man als Ascus. Die Sporen sind temperaturbeständig und vor Austrocknung geschützt. Bei einer Verbesserung des Nährstoffangebots können sie wieder zu haploiden Zellen auskeimen (Kupiec *et al.*, 1997). Ein Mangel an Kohlenstoffquellen führt bei haploiden und diploiden Hefezellen dazu, dass sie in der G1-Phase des Zellzyklus arretieren und in die Stationärphase übergehen (Hartwell *et al.*, 1974).

Abhängig vom Nährstoffangebot kann auch eine Veränderung der Wachstumsform von *S. cerevisiae* eintreten. So können haploide und diploide Zellen entweder in der einzelligen Hefeform wachsen oder bei Nährstoffmangel in ein mehrzelliges Stadium übergehen. Daher ist *S. cerevisiae* als dimorpher Organismus zu qualifizieren. Kommt es in Anwesenheit einer fermentierbaren Kohlenstoffquelle wie Glucose zu Stickstoffmangel, bilden diploide Hefezellen filamentöse Pseudohyphen aus (Gimeno *et al.*, 1992; Palecek *et al.*, 2002). Auch sezernierte Alkohole wie Butanol, oder Stress aufgrund von Sauerstoffmangel, Hitze oder hohen Salzkonzentrationen können das filamentöse Wachstum induzieren (Lorenz *et al.*, 2000; Cullen & Sprague, 2012). Pseudohyphen bestehen aus Ketten stark verlängerter Zellen, die sich durch unipolare Sprossung am distalen Pol vermehren. Die Tochterzellen lösen sich nach der Sprossung nicht mehr von den Mutterzellen ab, und das erneute Sprossen der Mutterzelle wird unterdrückt. Die Zellketten zeigen eine starke Haftung am Substrat und können es auch invasiv bewachsen (Gimeno *et al.*, 1992; Kron *et al.*, 1994; Roberts & Fink, 1994; Cullen & Sprague, 2000; Brückner & Mösch, 2012). Auch haploide Hefezellen zeigen bei einer Verschlechterung des Nährstoffangebots, wie zum Beispiel Glucosemangel, eine ähnliche multizelluläre Wachstumsform, namentlich das haploid invasive oder adhäsive Wachstum. Hierbei vermehrt sich *S. cerevisiae* durch bipolare Sprossung, bildet aber ebenfalls Ketten aus leicht verlängerten Zellen. Diese wachsen jedoch nicht wie beim Pseudohyphen-Wachstum über den Kolonierand hinaus (Roberts & Fink, 1994; Cullen & Sprague, 2000; Lorenz *et al.*, 2000). Da beim haploid adhäsiven Wachstum Hefezellen Aggregate auf Oberflächen wie Agar bilden, können sie auch als Biofilme bezeichnet werden (Reynolds & Fink, 2001; Brückner & Mösch, 2012). Im Folgenden wird der Begriff "Biofilmbildung" für das haploid adhäsive Wachstum von *S. cerevisiae* verwendet. Biofilme und Pseudohyphen dienen vermutlich der Erschließung neuer Nährstoffquellen (Gimeno *et al.*, 1992; Brückner & Mösch, 2012).

Bei dem Pflanzenpathogen *Ustilago maydis* oder der opportunistisch humanpathogenen Hefe *Candida albicans* ist die Filamentbildung essentiell für die Adhäsion an Wirtszellen oder die Invasion in Wirtsgewebe, und damit für die Virulenz dieser Organismen (Lo *et al.*, 1997; Bölker, 2001). Auch Biofilme sind von medizinischer Relevanz, da sie Epithelien oder abiotische Oberflächen wie Katheter besiedeln können (Calderone & Fonzi, 2001; Kojic & Darouiche, 2004).

1.3 Wachstum und Differenzierung in *S. cerevisiae*

Die Koordination von Wachstum und Differenzierung ist eine grundlegende Eigenschaft aller Organismen. Der Begriff "Wachstum" bezeichnet sowohl die Zunahme von Biomasse und Größe einzelner Zellen als auch die Zunahme der Zellzahl einer Population. Zelluläres Wachstum findet kontinuierlich während des gesamten Zellzyklus statt und beinhaltet vornehmlich die Synthese von Proteinen, während die Zunahme der Zellzahl an den Zellzyklus gebunden ist (Alberghina *et al.*, 2012). Zwei Faktoren, die durch diese Prozesse beeinflusst werden, sind Zellgröße und Differenzierung. Die Expression der rund 6000 Gene von *S. cerevisiae* muss bei der Steuerung von Wachstum und Differenzierung je nach Signal oder Bedingung differentiell exprimiert werden. Eine Möglichkeit hierzu sind Transkriptionsprogramme, die spezifisch an- oder abgeschaltet werden können. Diese Aufgabe übernehmen Transkriptionsfaktoren, von denen es in *S. cerevisiae* mehr als 200 gibt (www.yeasttract.com; Teixeira *et al.*, 2006). Aktivität und Menge der Transkriptionsfaktoren werden meist durch Signaltransduktionswege gesteuert. Die genannten Zahlen von Genen und Transkriptionsfaktoren machen deutlich, dass Transkriptionsfaktoren in verschiedenen Kombinationen zusammenwirken müssen, um die signalabhängige Ausführung der benötigten Transkriptionsprogramme zu bewirken. Dies bezeichnet man als kombinatorische Kontrolle (Hahn & Young, 2011). Zudem besitzt jeder Promotor eine eigene Garnitur von Transkriptionsfaktoren, die an ihn binden und das zugehörige Gen regulieren können. Diese Regulation ist die promotorspezifische Kontrolle.

Die exakten Mechanismen kombinatorischer und promotorspezifischer Kontrolle sind oft nicht bekannt. Bisherige Erkenntnisse basieren meist auf Messungen mit vollständigen Zellpopulationen. Auf Einzelzellebene ist noch weniger über die regulatorischen Prinzipien kombinatorischer und promotorspezifischer Kontrolle

bekannt. Eine zentrale Frage ist, welche Kombinationen von Transkriptionsfaktoren eine Zelle bei der Regulation von Wachstum und Differenzierung überhaupt benutzt.

1.3.1 Die Differenzierungsprogramme Konjugation und Biofilmbildung

Zu den Differenzierungsformen von *S. cerevisiae* gehören unter anderem die sexuelle Konjugation und multizelluläre Biofilme. Auf diesen beiden Differenzierungsprogrammen liegt der Fokus dieser Arbeit.

Bei der Konjugation findet eine pheromoninduzierte Zell-Zell-Adhäsion zwischen den Paarungspartnern statt. Dieser Adhäsion gehen der Arrest des Zellzyklus und eine morphologische Veränderung der Zellen, das "Shmooing" voraus (Herskowitz 1988) (Abb. 1.2).

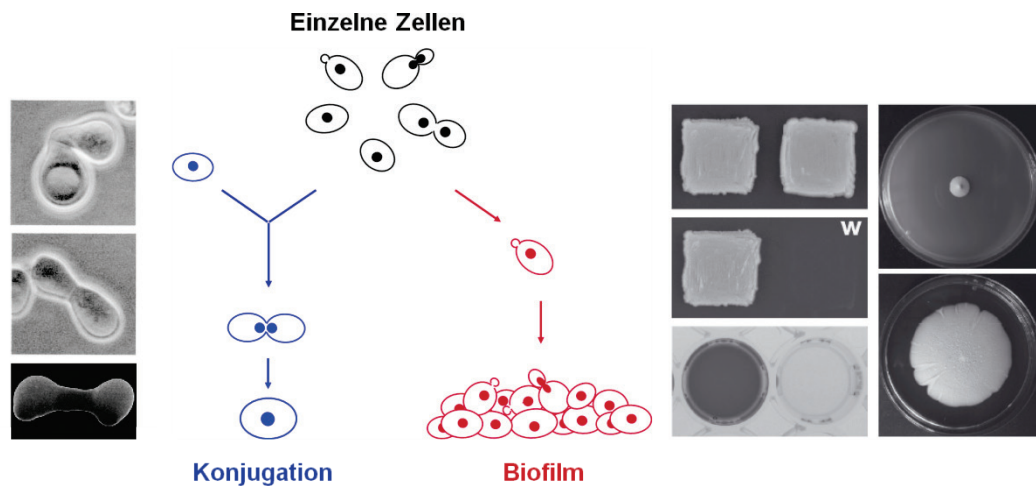


Abb. 1.2: Die Differenzierungsprogramme Konjugation und Biofilmbildung

Linke Seite: Bei der pheromoninduzierten Konjugation zwischen zwei *S. cerevisiae*-Zellen unterschiedlichen Paarungstyps bilden die Zellen zunächst eine Ausbuchtung in Richtung des Paarungspartners ("Shmooing"), dann erfolgen Zell-Zell-Adhäsion, Plasmogamie und Karyogamie (Bilder aus Elia & Marsh, 1998). Es entsteht eine diploide Zygote. Rechte Seite: Bei der nährstoffabhängigen Biofilmbildung von *S. cerevisiae* entstehen Zell-Aggregate, die mit Hilfe des Adhäsins Flo11 auf festem Agar (Fotos oben links) und auf halbfestem Agar (Fotos rechts) haften können. Ein nicht-adhäsiver *flo11Δ*-Stamm kann durch Waschen mit Wasser (W) entfernt werden (Foto Mitte links, rechte Seite). In Flüssigmedium (Foto unten links) bilden adhäsive Hefezellen ebenfalls Biofilme, die an Plastikoberflächen haften können. Ein *flo11Δ*-Stamm haftet nicht an Plastikoberflächen (Foto unten links rechte Seite) (Bilder aus Brückner & Mösch, 2012).

Für die pheromoninduzierte Zell-Zell-Adhäsion werden Oberflächenproteine wie das Membranprotein Fus1, die Agglutinine Aga1 und Aga2 und das Adhäsins Fig2 benötigt (Cappellaro *et al.*, 1994; Erdman, 1998; Trueheart *et al.*, 1987). Die pheromoninduzierte Konjugation wird durch das Fus3/Kss1-MAPK-Signalmodul gesteuert, das auch die Biofilmbildung kontrolliert (Bardwell, 2005; Chen & Thorner, 2007).

Vorteile von Biofilmen sind die optimale Verbreitung von Zellen, der Schutz vor Umwelteinflüssen und die Besiedelung von Substraten (Brückner & Mösch, 2012).

Wichtig ist hierbei die Steuerung der Zell-Zell- und der Zell-Substratadhäsion. Außerdem müssen die mit dem Wechsel des Lebensstils verbundenen zellulären Veränderungen wie die Verlängerung der Zellen und der Wechsel von Zellpolarität und Sprossungsmuster induziert und mit der Zellzykluskontrolle koordiniert werden. Der Übergang zur multizellulären Wachstumsform ist unter der Kontrolle eines komplexen regulatorischen Netzwerks, das viele evolutionär hochkonservierte Signalwege wie den Fus3/Kss1-MAPK-Weg, den Ras/PKA-Weg, den TOR-Signalweg oder die generelle Aminosäurekontrolle miteinschließt (Gimeno *et al.*, 1992; Mösch *et al.*, 1996; Cutler *et al.*, 2001; Braus *et al.*, 2003; Zaman *et al.*, 2008; Brückner *et al.*, 2011).

Ein Charakteristikum von Biofilmen ist die Adhäsion an Oberflächen. *S. cerevisiae* kann beispielsweise an Agar oder Plastik adhärieren (Roberts & Fink, 1994; Reynolds & Fink, 2001) (Abb. 1.2). In Biofilmen aus haploiden Zellen wird die Adhäsion an Agar oder Plastik, nicht aber die Zell-Zell-Adhäsion, durch das Zelloberflächen-Flokkulin Flo11 vermittelt (Lo & Dranginis, 1998; Rupp *et al.*, 1999; Guo *et al.*, 2000; Douglas *et al.*, 2007). Andere Flokkuline sind in den häufig verwendeten Laborstämmen Σ 1278b und S288c nicht aktiv (Halme *et al.*, 2004). *FLO11* besitzt einen außergewöhnlich langen Promotor von etwa 3 kb. Die *FLO11*-Expression wird durch eine Vielzahl von Faktoren, unter anderem durch den Transkriptionsfaktor Tec1, als Antwort auf externe und interne Signale gesteuert (Gavrias *et al.*, 1996; Mösch & Fink, 1997; Lo & Dranginis, 1998; Rupp *et al.*, 1999; Brückner & Mösch, 2012). Durch epigenetische Regulation ist die *FLO11*-Expression in einer Population sehr heterogen (Halme *et al.*, 2004; Vinod *et al.*, 2008).

1.3.1.1 Das Fus3/Kss1-MAPK-Modul

Das Fus3/Kss1-MAPK-Modul in *S. cerevisiae* steuert signalabhängig die beiden zellulären Differenzierungsprogramme Konjugation und Biofilmbildung. Es gibt programmspezifische Komponenten und solche, die zur Ausführung beider Programme genutzt werden (Abb. 1.3). Gemeinsam genutzte Komponenten sind die Rho-GTPase Cdc42, das Gerüstprotein Ste50, die Proteinkinase Ste20, die MAPKKK Ste11, die MAPKK Ste7, die beiden MAPKs Fus3 und Kss1 und der Transkriptionsfaktor Ste12 (Abb. 1.3) (Liu *et al.*, 1993; Roberts & Fink, 1994; Mösch *et al.*, 1996; Cook *et al.*, 1997; Madhani *et al.*, 1997; Mösch & Fink, 1997; Roberts *et al.*, 1997; Ramezani Rad *et al.*, 1998; Rupp *et al.*, 1999).

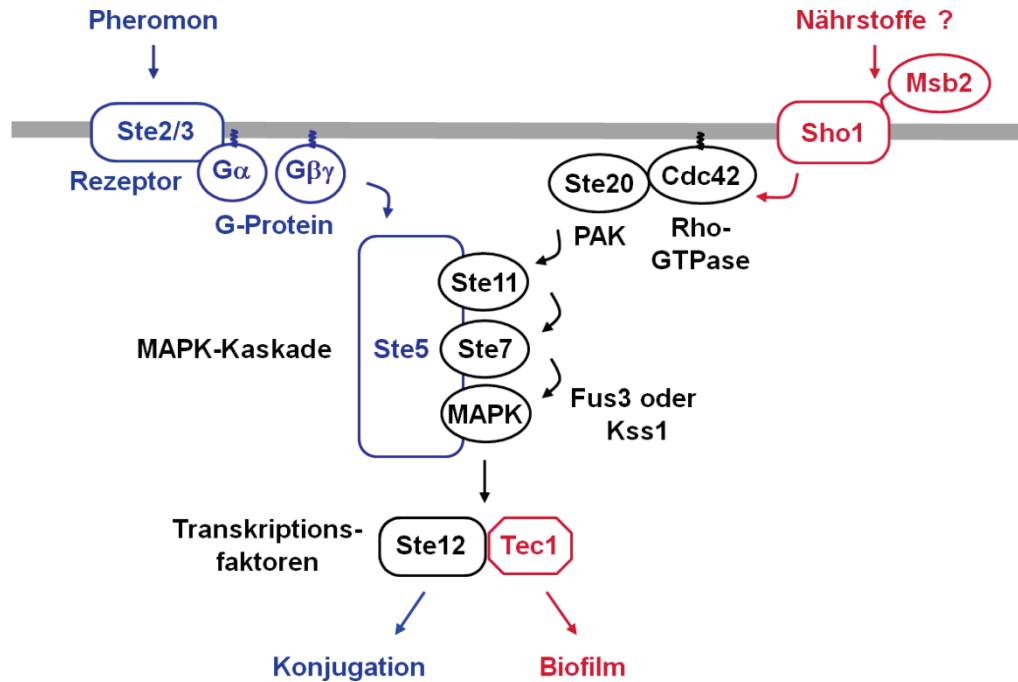


Abb. 1.3: Das Fus3/Kss1-MAPK-Modul aus *S. cerevisiae*

Schematische Darstellung der Signaltransduktion im Fus3/Kss1-MAPK-Modul unter Konjugations- und Biofilmbedingungen mit den wichtigsten Faktoren. Gemeinsam genutzte Komponenten sind schwarz, konjugations-spezifische Komponenten sind blau und biofilmspezifische Komponenten rot markiert. Die Zellmembran ist durch einen grauen Balken dargestellt.

Auch zwei Repressoren, Dig1 und Dig2, die mit Ste12, Fus3 und Kss1 interagieren, sind bei der Ausführung beider Differenzierungsprogramme beteiligt (Cook *et al.*, 1996; Cook *et al.*, 1997; Pi *et al.*, 1997; Tedford *et al.*, 1997; Bardwell *et al.*, 1998a; Roberts *et al.*, 2000, Chou *et al.*, 2006). Die MAPKs Fus3 und Kss1 besitzen bei der Ausführung beider Programme teilweise redundante Funktionen (Cook *et al.*, 1996; Hung *et al.*, 1997; Bardwell *et al.*, 1998b; Olson *et al.*, 2000; Bardwell, 2005).

Konjugationsspezifische Elemente des Signalweges sind die Pheromonrezeptoren Ste2 bzw. Ste3, das heterotrimere G-Protein und das Gerüstprotein Ste5 (Abb. 1.3) (Liu *et al.*, 1993; Roberts & Fink, 1994; Bardwell, 2005). Biofilmspezifische Elemente des Fus3/Kss1-MAPK-Moduls sind das signaldetektierende Mucin Msb2, das mit dem Membranprotein Sho1 und Cdc42 interagiert, und der Transkriptionsfaktor Tec1, der ein wichtiger Regulator von *FLO11* ist (Gavrias *et al.*, 1996; Mösch & Fink, 1997; Lo & Dranginis, 1998; Rupp *et al.*, 1999; Cullen *et al.*, 2004; Vadaie *et al.*, 2008).

Bei einem Pheromonsignal wird die α -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins durch den Rezeptor aktiviert und diese setzt dann den $G\beta\gamma$ -Komplex frei. Dieser rekrutiert Cdc24, welches als Guaninnukleotid-Austauschfaktor ("Guanin nucleotide exchange factor", GEF) für die Rho-GTPase Cdc42 fungiert. Cdc42 bindet und aktiviert dann die

PAK ("p21-activated kinase") Ste20 (Bardwell, 2005). Ste20 interagiert einerseits mit dem Formin Bni1, das für die Umorganisation des Aktincytoskeletts bei der "Shmoo"-Bildung benötigt wird (Matheos *et al.*, 2004). Andererseits rekrutiert Ste20 Ste5 an die Zellmembran, was die Aktivierung der MAPK-Kaskade (Ste11, Ste7, Fus3 und Kss1) bewirkt (Bardwell, 2005). Ohne Aktivierung durch vorgelagerte Kinasen bilden Fus3, Kss1, Ste12 und die beiden Inhibitoren Dig1 und Dig2 einen inaktiven Verband. Bei einem Pheromonsignal werden Fus3 und Kss1 durch Ste7 phosphoryliert. Fus3 und Kss1 phosphorylieren dann Ste12, Dig1 und Dig2, welche freigesetzt und somit aktiviert werden (Cook *et al.*, 1996; Cook *et al.*, 1997; Hung *et al.*, 1997; Tedford *et al.*, 1997; Bardwell *et al.*, 1998a). Ste12 kann dann die Aktivierung seiner Zielgene initiieren, zu denen *FAR1*, *FUS1*, *FIG2* und *TEC1* gehören. Der Zellzyklusinhibitor Far1 wird ebenfalls durch Fus3 aktiviert. Far1 bindet und inhibiert dann im Zellkern den Cdc28-Cln1-Komplex, was einen Arrest des Zellzyklus in der G1-Phase zur Folge hat (Peter & Herskowitz, 1994). Der Zellzyklusarrest in der G1-Phase ist notwendig, da nur in diesem Zeitabschnitt ein haploides Genom vorliegt, welches für die Entstehung einer Zygote mit exakt zwei Kopien des Genoms unabdingbar ist.

Der Transkriptionsfaktor Tec1 wird jedoch nicht für die Aktivierung von konjugations-spezifischen Genen benötigt, sondern ist eher hinderlich für ihre effiziente Transkription (Oehlen & Cross, 1998; Zeitlinger *et al.*, 2003; Chou *et al.*, 2006; Chou *et al.*, 2008). Um Signalspezifität zu erhalten, wird Tec1 bei einem Pheromonsignal abgebaut. Die Phosphorylierung durch Fus3 an Threonin 273 dient als Markierung für einen schnellen Ubiquitin-vermittelten Abbau von Tec1 (Bao *et al.*, 2004; Brückner *et al.*, 2004; Chou *et al.*, 2004). Eine Folge dieser Tec1-Degradierung ist die drastische Abnahme der *FLO11*-Expression unter Konjugationsbedingungen. Gleichzeitig wird durch die Anwesenheit von Tec1 eine Aktivierung von Konjugationsgenen unter vegetativen Bedingungen verhindert. Außerdem gibt es unterschiedliche Komplexe zwischen Ste12, Tec1, Dig1 und Dig2. Während unter Paarungsbedingungen überwiegend ein Ste12-Dig1-Dig2-Komplex zu finden ist, kann unter vegetativen Bedingungen Tec1 Dig2 kompetitiv verdrängen, sodass ein Tec1-Ste12-Dig1-Komplex entsteht (Chou *et al.*, 2006).

Obwohl der Fus3/Kss1-MAPK-Weg einer der bestuntersuchten eukaryotischen Signalwege ist, ist die quantitative Dynamik der Signaltransduktion noch nicht genau bekannt. Der beschriebene Ablauf der Signalweiterleitung und das Verhalten der einzelnen

Komponenten stammen aus Daten von Zellpopulationen, die mit biochemischen Methoden generiert wurden. Eine zentrale regulatorische Funktion kommt jedoch dem Transkriptionsfaktor Tec1 zu. Da Tec1 nicht nur über das MAPK-Modul, sondern auch über den TOR-Signalweg kontrolliert wird (Brückner *et al.*, 2011), stellt sich die Frage nach der möglichen Verknüpfung dieses Faktors mit weiteren Funktionen.

1.3.1.2 Der Ras/PKA-Signalweg

Der Ras/PKA-Signalweg kontrolliert viele wichtige zelluläre Prozesse wie Metabolismus, Stressantworten oder Sporulation (Thevelein & de Winde, 1999; Thevelein *et al.*, 2005). Parallel zum Fus3/Kss1-MAPK-Modul beeinflusst der Ras/PKA-Weg die *FLO11*-abhängige Biofilmbildung in *S. cerevisiae* (Robertson & Fink, 1998; Pan & Heitman, 1999; Rupp *et al.*, 1999). Zudem hat er Einfluss auf die Ribosomenbiogenese und somit auf das Zellwachstum (Jorgensen & Tyers, 2004).

Die wichtigsten Komponenten dieses Signalweges sind die Adenylylcyclase Cyr1 und die PKA (Proteinkinkase A). Cyr1 katalysiert die Synthese von cAMP aus ATP. Der cAMP-Abbau erfolgt durch die Phosphodiesterasen Pde1 und Pde2. Die PKA besteht aus der regulatorischen Untereinheit Bcy1 und den katalytischen Untereinheiten Tpk1, Tpk2 und Tpk3 (Tamaki, 2007). Ist cAMP in der Zelle vorhanden, bindet es an Bcy1, was die Aktivierung der PKA zur Folge hat. Extrazellulär vorhandene Glucose kann Cyr1 aktivieren, indem sie an den Rezeptor Gpr1 bindet, der mit dem $G\alpha$ -Protein Gpa2 interagiert. Gpr1 und Gpa2 stimulieren Cyr1, was zu einem Anstieg der zellulären cAMP-Menge und somit der PKA-Aktivität führt (Toda *et al.*, 1985; Kraakman *et al.*, 1999). Die PKA kann außerdem abhängig von intrazellulär vorhandener Glucose durch aktivierte Formen der kleinen GTP-bindenden Proteine Ras1 und Ras2 reguliert werden. Über Ras1 und Ras2 ist der Ras/PKA-Signalweg mit dem Fus3/Kss1-MAPK-Modul vernetzt, da beide Proteine Ste20 aktivieren können und Ras2 die *MSB2*-Expression regulieren kann (Gimeno *et al.*, 1992; Mösch *et al.*, 1996; Rupp *et al.*, 1999; Chavel *et al.*, 2010). Tpk2 stimuliert die Expression von *FLO11*, indem es den Repressor Sfl1 inhibiert und den Transkriptionsfaktor Flo8 aktiviert. Flo8 und Sfl1 besitzen überlappende Bindestellen im *FLO11*-Promotor (Robertson & Fink, 1998; Pan & Heitman, 1999; Rupp *et al.*, 1999). Tpk1 und Tpk3 haben einen negativen Einfluss auf die *FLO11*-Expression. Dies geschieht vermutlich durch die negative Rückkopplung mit der cAMP-Produktion (Pan & Heitman, 1999; Robertson *et al.*, 2000).

Die PKA reguliert auch die Transkriptionsfaktoren Msn2 und Msn4, deren Transport in den Zellkern bei diversen Stressbedingungen wie Hitzeschock, oxidativem oder osmotischem Stress verstärkt wird (Martínez-Pastor *et al.*, 1996; Görner *et al.*, 1998). Dort können Msn2 und Msn4 die Transkription von rund 200 Genen aktivieren, die bei einer Stressantwort benötigt werden (Gasch *et al.*, 2000; Causton *et al.*, 2001). Msn2 und Msn4 werden ebenfalls vom TOR-Signalweg kontrolliert (Rohde *et al.*, 2008).

1.3.1.3 Der TOR-Signalweg

Der hochkonservierte TOR-Signalweg hat Einfluss auf eine Vielzahl von Wachstums- und Differenzierungsvorgängen in der Zelle, die er nährstoffabhängig steuert (Crespo & Hall, 2002; Loewith & Hall, 2011). Das Hauptelement dieses Weges ist der TOR-Komplex 1 (TORC1) mit der TOR1-Kinase ("target of rapamycin"), der durch das makrozyklische Lacton Rapamycin inhibiert werden kann (Heitman *et al.*, 1991). In *S. cerevisiae* gibt es eine paraloge TOR2-Kinase, die TOR1-unabhängige Funktionen bei Zellpolarität und Meiose ausübt (Schmidt *et al.*, 1996; Zheng & Schreiber, 1997). Die Funktionen von TORC1 liegen in der Kontrolle von Translation und Ribosomenbiogenese, Autophagie, Transkription und Zellzyklus (Loewith *et al.*, 2002). Inhibierung von TORC1 bei Nährstoffmangel oder Stress, oder durch Rapamycin, führt zu einer Reduktion der Proteinsynthese und damit zu einer Reduktion des Zellwachstums. Höhere Dosen von Rapamycin induzieren einen G1-Arrest des Zellzyklus (Heitman *et al.*, 1991).

Unter guten Nährstoffbedingungen inhibiert TORC1 Transkriptionsfaktoren, die für die Expression von Stress- oder Aminosäuremangel-induzierten Genen verantwortlich sind, so zum Beispiel Gln3 oder Msn2 und Msn4 (Shamji *et al.*, 2000; Monteiro & Netto, 2004). Gleichzeitig aktiviert er Faktoren, die das Zellwachstum fördern, wie Sfp1 und Fhl. Diese können die Ribosomenbiogenese positiv beeinflussen (Marion *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2004). Meist wird die Lokalisierung dieser Regulatoren durch ihre Phosphorylierung durch TORC1-kontrollierte Kinasen wie die Phosphatase Sit4 gesteuert (Beck & Hall, 1999).

Der TOR1-Signalweg beeinflusst auch die Nährstoffmangel-induzierte Biofilmbildung von Hefezellen (De Virgilio & Loewith, 2006). Geringe Dosen von Rapamycin hemmen die Filamentbildung (Cutler *et al.*, 2001). In einer aktuellen Studie konnte nachgewiesen werden, dass die Stabilität des Transkriptionsfaktors Tec1 unter

Rapamycin stark verringert ist und dass Tec1 als Bindeglied zwischen dem Fus3/Kss1-MAPK-Signalweg und dem TOR1-Netzwerk fungiert (Brückner *et al.*, 2011).

1.3.1.4 Die generelle Aminosäurekontrolle

Aminosäuremangel und gleichzeitige Anwesenheit von Glucose und Ammonium führen ebenfalls zur Induktion der Biofilmbildung in *S. cerevisiae* (Braus *et al.*, 2003). Die generelle Aminosäurekontrolle steht auch unter der Kontrolle von TORC1 (Cutler *et al.*, 2001). Hauptkomponenten der generellen Aminosäurekontrolle sind die Sensorkinase Gcn2 und der Transkriptionsfaktor Gcn4 (Hinnebusch, 2005). Fehlt eine Aminosäure oder herrscht ein Ungleichgewicht von Aminosäuren, erhöht sich die Anzahl unbeladener tRNAs bei der Translation. Dies wird von Gcn2 detektiert. Gcn2 phosphoryliert dann den Translationsinitiationsfaktor eIF2, was zu einer Aktivierung der *GCN4*-Transkription und Erhöhung der Gcn4-Stabilität führt (Hinnebusch, 1997). Gcn4 aktiviert dann die Transkription von Genen, die unter anderem für die Aminosäurebiosynthese benötigt werden (Natarajan *et al.*, 2001).

1.3.2 Der Zellzyklus in *S. cerevisiae*

Die Regulation aller Differenzierungsprogramme muss mit der Zellzyklussteuerung koordiniert werden. Die präzise Steuerung des Zellteilungszyklus ist essentiell, um exakte Kopien der Mutterzelle zu generieren. Nach der Replikation der Chromosomen muss das genetische Material gleichmäßig zwischen Mutter- und Tochterzelle aufgeteilt werden. Alle Schritte der Duplikation und Segregation dürfen nur einmal pro Zellzyklus stattfinden und müssen zum richtigen Zeitpunkt ablaufen. Der Zellzyklus lässt sich in 4 Hauptphasen unterteilen (Abb. 1.4). In der G1-Phase nehmen neu entstandene Tochterzellen zunächst an Größe zu. Dies ist notwendig, da sich *S. cerevisiae* asymmetrisch teilt und Tochterzellen kleiner als Mutterzellen sind. Mutterzellen müssen eine bestimmte Zellgröße erreicht haben, wenn sie zum ersten Mal eine Sprossung beginnen, danach teilen sich selbst kleine Mutterzellen regelmäßig (Hartwell & Unger, 1977; Lord & Wheals, 1983). In der späten G1-Phase findet der Übergang in einen neuen Zellzyklus statt. Dieser Prozess wird als "START" bezeichnet (Johnston *et al.*, 1977). An diesem Punkt werden interne und externe Signale über Nährstoffverfügbarkeit, die Anwesenheit von Pheromon, das Vorhandensein einer kritischen Zellgröße oder den Metabolismus integriert. Die Zelle entscheidet dann, ob

sie ein Differenzierungsprogramm ausführt oder einen neuen Zyklus beginnt (Pringle & Hartwell, 1981; Smets *et al.*, 2010). In der S-Phase (Synthesephase) erfolgt dann die Replikation der Chromosomen, während in der G2-Phase ("Gap"-Phase) der Spross an Biomasse zunimmt. In der M-Phase (Mitosephase) erfolgen die Segregation der Chromosomen und die Cytokinese.

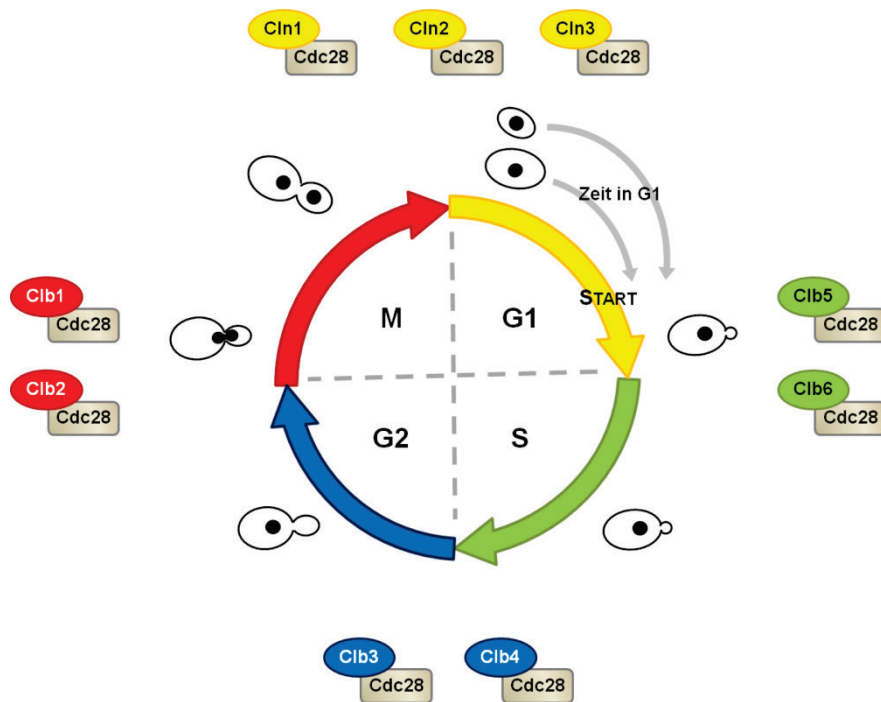


Abb. 1.4: Der Zellzyklus in *S. cerevisiae*

Verlauf des Zellteilungszyklus von *S. cerevisiae*. In der G1-Phase erfolgt die Größenzunahme von neu entstandenen Tochterzellen. In der späten G1-Phase findet der Übergang in einen neuen Zellzyklus statt (START) und die Sprossung beginnt. Es folgt die Replikation der Chromosomen in der S-Phase. In der G2-Phase nimmt der Spross an Biomasse zu. In der M-Phase (Mitosephase) erfolgen die Segregation der Chromosomen und die Cytokinese. Zellzyklusphasenspezifische Cdc28-Cyclin-Komplexe am entsprechenden Phasenübergang sind eingezeichnet.

DNA-Replikation, zelluläre Differenzierung und Größenwachstum müssen genau aufeinander abgestimmt sein. Die Regulation dieser Ereignisse wird in eukaryotischen Zellen durch Cyclin-abhängige Kinasen ("Cyclin-dependent Kinases", CDKs) ausgeführt. CDKs sind die katalytischen Untereinheiten von Kinasekomplexen. In *S. cerevisiae* ist eine einzige CDK (Cdk1 bzw. Cdc28) ausreichend, um den Zellzyklus zu steuern. Die zellzyklusabhängige Aktivität und die Spezifität von CDKs werden durch ihre Assoziation mit Cyclinen erreicht. Cyclin-Gene werden periodisch exprimiert und die Stabilität der Cycline ist ebenfalls zellzyklusabhängig reguliert. In *S. cerevisiae* interagiert Cdc28 mit 9 unterschiedlichen Cyclinen. Bei "START" und beim Übergang von der G1- in die S-Phase werden die Cycline Cln1-3 benötigt. Für die

Initiation der S-Phase sind Clb5 und Clb6 wichtig. Clb3 und Clb4 vermitteln den Übergang in die G2-Phase, während die Zelle für den Übergang in die M-Phase die Cycline Clb1 und Clb2 braucht (Abb. 1.4) (Enserink & Kolodner, 2010).

Die Cyclin-CDK-Komplexe aktivieren Zellzyklusphasen-spezifische Transkriptionsprogramme, so zum Beispiel das "G1-Cluster", dem rund 200 Gene angehören (Spellman *et al.*, 1998). Diese Gene werden durch die heterodimeren Transkriptionsfaktoren MBF und SBF gebunden und reguliert (Spellman *et al.*, 1998; Iyer *et al.*, 2001). Der MBF-Komplex (Mlu1-Box-Bindefaktor) enthält das DNA-Bindeprotein Mbp1, der SBF-Komplex (Swi4/6-Zellzyklusbox-Bindefaktor) das DNA-Bindeprotein Swi4 (Andrews & Herskowitz, 1989; Koch *et al.*, 1993). Zu beiden Komplexen gehört der Regulator Swi6, der direkt mit Mbp1 oder Swi4 interagiert (Dirick *et al.*, 1992). MBF und SBF interagieren zudem beide mit Msa1 und Msa2 (Ashe *et al.*, 2008; siehe auch Abschnitt 1.3.2.2). Obwohl MBF und SBF viele "G1-Cluster-Gene" gemeinsam regulieren, haben MBF und SBF auch eigene Funktionen. MBF reguliert Gene, die für DNA-Replikation und -Reparatur benötigt werden, wie *POL2*, *CDC2*, *RNR1*, *CLB5* und *CLB6*. SBF reguliert Gene, die wichtig für den Ablauf des Zellzyklus, die Zellmorphogenese und die Spindelpolkörper-Duplikation sind, wie *CLN1*, *CLN2*, *PCL1*, *PCL2*, *GIN4*, *FKS1* und *FKS2* (Wittenberg & Reed, 2005). Die DNA-Bindestelle für Mbp1, MCB (Mlu1 "cell cycle box"), ist ACGCGTCA (Zhu *et al.*, 2009), die für Swi4, SCB (Swi4/6 "cell cycle box"), ist CRCGAAA (MacIsaac *et al.*, 2006).

Ein weiteres wichtiges Transkriptionsprogramm im Zellzyklus ist das *CLB2*-Cluster, das vor allem vom Transkriptionsfaktor Fkh1 während dem G2/M-Übergang gesteuert wird. Zum *CLB2*-Cluster gehören etwa 30 Gene wie *CLB1*, *CLB2*, *CDC5*, *SWI5* oder *ACE2*, die während der anschließenden Zellzyklusphasen M und G1 wichtig sind (Spellman *et al.*, 1998).

Eine bedeutende Eigenschaft des Zellzyklus ist die Möglichkeit seiner Anpassung an Differenzierungssignale. Das Umschalten von der Hefeform zur Biofilm- oder Filamentbildung erfordert eine Modifikation der Zellzyklusregulation. In diploiden, filamentös wachsenden *S. cerevisiae*-Zellen erfolgt die Sprossung im Gegensatz zu Zellen in Hefeform synchron, da keine Zunahme der Zellgröße in der G1-Phase zu beobachten ist (Kron *et al.*, 1994). Eine weitere Anpassung des Zellzyklus erfolgt unter dem Einfluss von Pheromon, welches unter Beteiligung des Zellzyklusinhibitors Far1 einen Arrest in der G1-Phase induziert (Peter & Herskowitz, 1994). Die Ausführung des

Konjugationsprogramms bringt außerdem die Abnahme der Cyclin-Expression mit sich (Wittenberg *et al.*, 1990; Brückner *et al.*, 2004). Auch der vom Fus3/Kss1-MAPK-Modul gesteuerte Transkriptionsfaktor Tec1 kann die Expression von *CLN1* regulieren (Madhani *et al.*, 1999). Eine stabile Tec1-Version, die bei der Konjugation nicht mehr abgebaut werden kann, behindert die Abnahme der *CLN1*-Expression unter Pheromon und einen effizienten G1-Arrest (Brückner *et al.*, 2004). Zudem können Cln1 und Cln2 die *FLO11*-Expression aktivieren (Loeb *et al.*, 1999).

1.3.2.1 Die Regulation von TEC1 im Zellzyklus

TEC1 ist ein zellzyklusreguliertes Gen, dessen maximale Expression beim Übergang von der M- zur G1-Phase zu beobachten ist (Spellman *et al.*, 1998; Pramila *et al.*, 2006). Es gibt Hinweise darauf, dass diese Regulation von SBF vermittelt wird, da in einem *swi4Δ*-Stamm die *TEC1*-Expression reduziert ist (Iyer *et al.*, 2001). Es ist möglich, dass Tec1 neben seiner Funktion bei der Regulation von *CLN1* weitere zellzyklusassoziierte Gene direkt beeinflusst, da sie jeweils mehrere Tec1-Bindestellen in ihren Promotoren besitzen, und bei denen eine Bindung durch Tec1 bereits nachgewiesen wurde. Dies sind unter anderem *ACT1*, *GIC2*, *SIM1* und *GIC2* (Zeitlinger *et al.*, 2003; Harbison *et al.*, 2004). Eine *in-silico*-Studie identifiziert durch Integration verschiedenster publizierter Daten Tec1 und auch Ste12 als "neue" Zellzyklusregulatoren (Wu & Li, 2008). *STE12*, *DIG1* und *DIG2* sind jedoch selbst nicht zellzyklusreguliert (Spellman *et al.*, 1998).

1.3.2.2 Die Co-Regulatoren Msa1 und Msa2

Über die genauen zellulären Funktionen von Msa1 und Msa2 und ihre Interaktionspartner ist bislang wenig bekannt. Msa1 und Msa2 wurden, mit einer Gal4-DNA-Bindedomäne fusioniert, zunächst als starke Transkriptionsaktivatoren charakterisiert (Titz *et al.*, 2006). Msa1 und Msa2 besitzen keine eigenen DNA-Bindedomänen. Die Namensgebung erfolgte in Ashe *et al.*, 2008, die Msa1 und Msa2 als Interaktionspartner der G1-spezifischen Transkriptionsfaktorkomplexe MBF und SBF identifizierten. "Msa" steht für "MBF and SBF associated". Die Expression von *MSA1* (*YOR066W*) und *MSA2* (*YKR077W*) ist zellzyklusreguliert. Die *MSA1*-Transkriptmenge erreicht ein Maximum beim M/G1-Übergang, während die Transkriptmenge von *MSA2* in der G1-Phase des Zellzyklus am größten ist (Spellman *et al.*, 1998). Auch auf

posttranskriptioneller Ebene sind Msa1 und Msa2 stark zellzyklusreguliert. In mit α -Faktor synchronisierten Zellen akkumuliert Msa1 am stärksten in G1, kurz vor der Knospung, und wird in der frühen S-Phase sehr schnell abgebaut (Ashe *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008). Msa2 zeigt ein ähnliches Muster, wird aber etwas langsamer abgebaut als Msa1 (Li *et al.*, 2008).

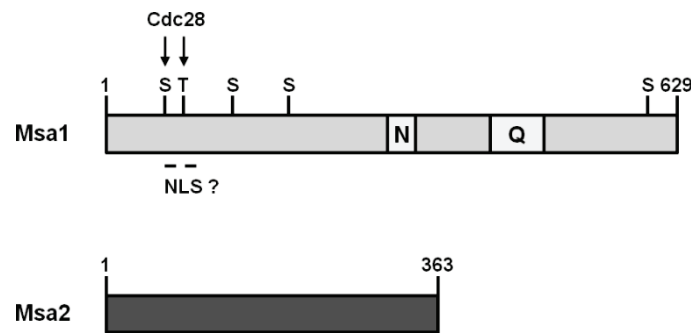


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Co-Regulatoren Msa1 und Msa2

Msa1 ist 629 Aminosäuren lang. Im Bereich der Aminosäuren 317-333 befindet sich eine asparaginreiche Region (N) und im Bereich der Aminosäuren 446-475 eine glutaminreiche Region (Q). Mögliche Phosphorylierungsstellen sind S167, S234 und S601. Die Phosphorylierung durch Cdc28 an S53 und T84 vermittelt den zellzyklusabhängigen Transport von Msa1 in den Zellkern. Putative NLSs liegen zwischen den Aminosäuren 53-63 (PSPNKRRLSID) und 84-92 (TPTKKSSTN). Msa2 ist 363 Aminosäuren lang. Für Msa2 sind keine Phosphorylierungsstellen bekannt.

Msa1 interagiert mit Mbp1, Swi4 und Swi6 und assoziiert mit den MBF-regulierten Promotoren *RNR1* und *CDC21* und den SBF-regulierten Promotoren *CLN2* und *SVS1* (Ashe *et al.*, 2008). Msa1 ist wie Cln3 und Whi5 notwendig für die zeitliche Abstimmung der Zellzyklusregulation: eine *MSA1*-Überexpression führt zu einer verfrühten G1-spezifischen Transkription und Initiation eines neuen Zellzyklus, während ein *MSA1*-Mangel diesen Zeitpunkt hinauszögert (Ashe *et al.*, 2008). Außerdem führt die Deletion von *MSA1* zu einer Verzögerung des S-Phasen-Eintritts von synchronisierten *S. cerevisiae*-Zellen (Li *et al.*, 2008). Eine analoge Funktion von Msa2 wird aufgrund der Ähnlichkeit zu Msa1 und der zellzyklusabhängigen Schwankungen der Msa2-Mengen vermutet. Msa2 interagiert ebenfalls mit Swi4 und Swi6 (Ashe *et al.*, 2008; Krogan *et al.*, 2006).

Die paralogen Proteine Msa1 und Msa2 sind 629 bzw. 363 Aminosäuren lang und besitzen im S288c-Stammhintergrund 28 % identische und 43 % ähnliche Aminosäuren (Ashe *et al.*, 2008). Msa1 besitzt im Bereich der Aminosäuren 317-333 eine asparaginreiche Region und im Bereich der Aminosäuren 446-475 eine glutaminreiche Region (www.uniprot.org) (Abb. 1.5).

Mögliche Phosphorylierungsstellen sind S167, S234 und S601 (Albuquerque *et al.*, 2008). Ferner konnte eine Phosphorylierung durch Cdc28 an S53 und T84

nachgewiesen werden, die den zellzyklusabhängigen Transport von Msa1 in den Zellkern vermittelt (Übersax *et al.*, 2003; Kosugi *et al.*, 2009). Hieraus ergeben sich putative NLSs ("nuclear localization signals", Kernlokalisierungssignale) zwischen den Aminosäuren 53-63 (PSPNKRRLSID) und 84-92 (TPTKKSSTN). Für Msa2 sind keine möglichen Phosphorylierungsstellen bekannt. Bislang wurden keine Homologien zu Proteinen aus anderen Organismen gefunden, daher gelten Msa1 und Msa2 bis dato als pilzspezifisch. Interessanterweise gibt es Sequenzunterschiede zwischen *MSA1* aus dem S288c-Stammhintergrund und *MSA1* aus dem Σ 1278b-Hintergrund. Der DNA-Sequenzvergleich ergibt 15 Basenänderungen von S288c zu Σ 1278b, die in 6 Aminosäureaustauschen resultieren. 5 liegen in der N-terminalen Hälfte des Proteins, die eine größere Ähnlichkeit zu Msa2 aufweist als der Msa1-C-Terminus. Kein Aminosäureaustausch betrifft jedoch oben beschriebene Regionen oder Phosphorylierungsstellen von Msa1. *MSA2* besitzt keine Sequenzunterschiede zwischen Σ 1278b und S288c.

1.3.3 Die Regulation der Zellgröße

Die Größe von Zellen, Geweben und Organen ist ein maßgebliches Merkmal von biologischen Systemen, das von Wachstum und Differenzierung beeinflusst wird. Die genauen molekularen Kontrollmechanismen zur Kopplung der Zellgrößenregulation an die Regulation der zellulären Differenzierung sind erst ansatzweise verstanden und implizieren unterschiedliche Signaltransduktionswege und mit ihren oft komplexen Vernetzungen untereinander. Fehlfunktionen dieser Mechanismen können jedoch zu unkontrolliertem Zellwachstum führen. Die Erforschung der Zellgrößenregulation in *S. cerevisiae* hat in den letzten Jahren zu einigen neuen Erkenntnissen geführt, die im Folgenden näher betrachtet werden. *S. cerevisiae* kontrolliert die Zellgröße überwiegend durch die Regulation ihres Zellteilungszyklus als Reaktion auf die Wachstumsrate, die abhängig vom Nährstoffangebot ist (Turner *et al.*, 2012) (Abb. 1.6). Weitere Faktoren, die die Zellgröße beeinflussen, sind die Kopienzahl des Genoms (Ploidie), stressinduzierte Signalwege, Sekretionsmechanismen oder mitochondriale Funktionen (Jorgensen *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002; Cook & Tyers, 2007).

Im Zellteilungszyklus von Hefezellen ist "START" am G1/S-Phasenübergang der wichtigste Kontrollpunkt für die Zellgröße. Neu entstandene Tochterzellen müssen eine kritische Größe erreichen, um die Sprossung zu induzieren. Kleine Zellen verbleiben länger in der G1-Phase, bis sie eine kritische Größe erreicht haben, während große Zellen den Zellzyklus schneller durchlaufen (Abb. 1.4) (Nurse, 1975; Johnston *et al.*, 1977). Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen G1-spezifischer Transkription und Zellgrößenkontrolle (Johnston *et al.*, 1977; Nash *et al.*, 1988; Schneider *et al.*, 2004).

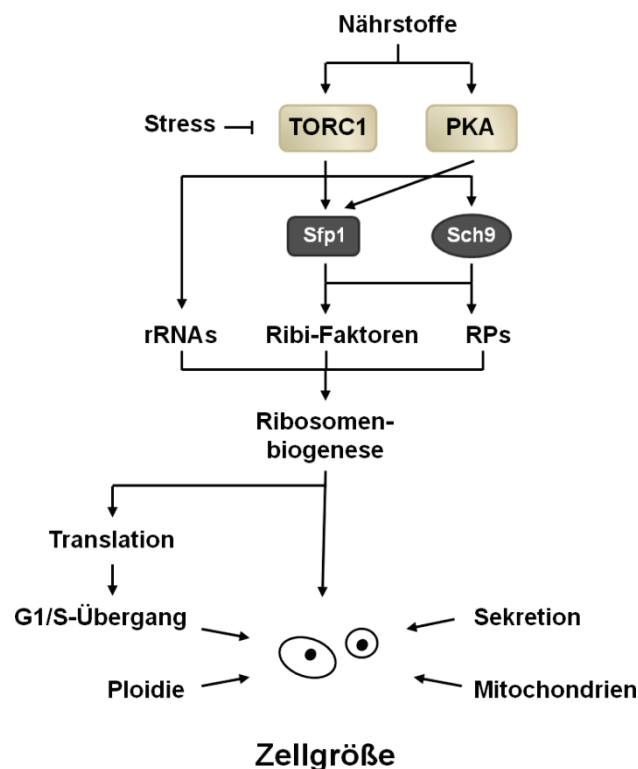


Abb. 1.6: Die Regulation der Zellgröße in *S. cerevisiae*

Schematische Darstellung der wichtigsten Signalwege und Faktoren, die die Zellgröße in *S. cerevisiae* beeinflussen. Nährstoffsignale werden durch die Kinasen TORC1, PKA und Sch9 weitergeleitet, die vielfältig miteinander vernetzt sind. Die Ribosomenbiogenese-Rate wird hauptsächlich durch den Regulator Sfp1 beeinflusst, der die Transkription von Genen für rRNAs, Ribosomenbiogenese-(Ribi-)Faktoren und ribosomale Proteine (RPs) als Antwort auf interne und externe Signale steuert. Die Ribosomenbiogenese-Rate beeinflusst den G1/S-Übergang im Zellzyklus über die Translationsrate. Der G1/S-Übergang hat ebenfalls Einfluss auf die Zellgröße, da der Zeitpunkt der G1-spezifischen Transkriptionsinitiation hierbei eine Rolle spielt. Weitere Faktoren, die die Zellgröße beeinflussen, sind Ploidie, Sekretionsmechanismen oder mitochondriale Funktionen. Modifiziert nach Cook & Tyers, 2007.

Die Transkriptionsfaktorkomplexe MBF und SBF steuern zusammen mit Msa1 den G1/S-Übergang, daher spielen sie eine wichtige Rolle bei der zellzyklusabhängigen Regulation der Zellgröße (de Bruin *et al.*, 2008; Ashe *et al.*, 2008; Costanzo *et al.*, 2010). Ein weiterer Kontrollpunkt wird am G2/M-Phasenübergang vermutet, wie es auch bei der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* oder bei Amöben der Fall ist

(Jorgensen & Tyers, 2004; Turner *et al.*, 2012). In *S. cerevisiae* kann eine Störung des Sprosswachstums eine Verzögerung des G2/M-Übergangs verursachen (Harvey & Kellogg, 2003). Zudem scheint bei filamentös wachsenden Zellen die Größenzunahme vorrangig in der G2-Phase zu erfolgen (Kron *et al.*, 1994).

Zellen unter nährstoffarmen Bedingungen sind kleiner als solche, die in nährstoffreichem Medium wachsen. Ein Wechsel der jeweiligen Bedingung zur anderen führt zur schnellen Anpassung der Zellgröße (Johnston *et al.*, 1977). Der zellimmanente Mechanismus zur Regulation der Zellgröße ist vermutlich die Proteinsyntheserate, die abhängig von der Nährstoffverfügbarkeit gesteuert wird (Jorgensen *et al.*, 2002; Jorgensen & Tyers, 2004; Cook & Tyers, 2007; Turner *et al.*, 2012).

Signalwege, die nährstoffabhängig reguliert werden, kontrollieren die Ribosomenbiogenese, die Expression von Genen, die für ribosomale Proteine codieren und die allgemeine Translationsrate. Eine zentrale Rolle hierbei spielt der Transkriptionsfaktor Sfp1, der eine Vielzahl von Genen kontrolliert, die für Ribosomenbestandteile und die Ribosomenbiogenese benötigt werden. Sfp1 wird unter anderem durch den TOR-Signalweg und den PKA-Signalweg gesteuert (Jorgensen & Tyers, 2004; Marion *et al.*, 2004). Noch ist jedoch unklar, über welche Faktoren die Ribosomenbiogenese an die G1/S-Zellzykluskontrolle gekoppelt ist.

1.3.3.1 Die Regulation der Ribosomenbiogenese

Das Wachstum von Zellen, Geweben und Organen ist eng an die Proteinsynthese gekoppelt. Die Ribosomenentstehung bestimmt also die Wachstumskapazität von lebenden Systemen. Die Regulation dieses Prozesses erfordert daher die Eingliederung einer Vielzahl an externen und internen Signalen und ist vernetzt mit der Kontrolle des Zellteilungszyklus. Die Ribosomenbiogenese beinhaltet die Synthese von ribosomalen RNAs (rRNAs, 75 Gene), ribosomalen Proteinen (RPs, 37 Gene) und Ribosomenbiogenese-Faktoren (Ribi-Faktoren, ungefähr 200 Gene) (Abb. 1.6), die von allen drei RNA-Polymerasen der Zelle ausgeführt wird (Lempiäinen & Shore, 2009). Die Ribosomensynthese kann bis zu 50 % der zellulären Transkription beanspruchen (Warner *et al.*, 2001). Die Deletion vieler Gene, die für Ribi-Faktoren und ribosomale Proteine codieren, führt durch die Verringerung von Zellwachstum und Translationsrate zu einer Verkleinerung der Zellen (Jorgensen *et al.*, 2002).

Wie im vorhergehenden Abschnitt erwähnt, ist Sfp1 ein zentraler PKA- und TOR1-abhängiger Regulator der Ribosomenbiogenese. Sfp1 interagiert direkt mit TORC1. Bei Phosphorylierung durch TORC1 wird Sfp1 aktiviert und lokalisiert dann im Zellkern. Obwohl an vielen RP-Genen die Bindung von Sfp1 nachgewiesen wurde, wird vor allem die Expression der meisten Ribi-Faktoren-Gene durch Sfp1 positiv beeinflusst. Bei Nährstoffmangel oder Stress wird Sfp1 durch die Interaktion mit Mrs6 im Cytoplasma gehalten. Mrs6 ist eine Komponente des Sekretionswegs (Lempiäinen & Shore, 2009; Singh & Tyers, 2009). Die Deletion von *SFP1* führt zu kleineren Zellen (Jorgensen *et al.*, 2002). Ein weiterer Regulator ist Fhl1, der zusammen mit dem Co-Aktivator Ifh1 Stress- und Nährstoffabhängig die Expression von RP-Genen aktivieren kann. Die Lokalisierung von Fhl1 und Ifh1 wird wahrscheinlich von Sfp1 kontrolliert (Lempiäinen & Shore, 2009; Turner *et al.*, 2012). Bei der Deletion von *FHL1* ist keine Zellgrößenveränderung zu verzeichnen (Jorgensen *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002).

Ähnlich wie Sfp1 wird auch die Proteinkinase Sch9 über den TOR-Signalweg reguliert und hat Einfluss auf die Zellgröße (Abb. 1.6) (Urban *et al.*, 2007). Sch9 aktiviert die Expression von Genen für die Ribosomenbiogenese durch die Inaktivierung der transkriptionellen Repressoren Stb3, Dot6 und Tod6 (Cook & Tyers, 2007; Lempiäinen & Shore, 2009; Huber *et al.*, 2011; Turner *et al.*, 2012). Die Ribosomenbiogenese kann auch die Lebensspanne von *S. cerevisiae* oder dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* beeinflussen. Die Deletion von RP-Genen oder *SCH9* führt zu einer Verlängerung der Lebensspanne (Lempiäinen & Shore, 2009).

1.4 Die Transkriptionsfaktoren Tec1 und Ste12

1.4.1 Die Familie der TEA-Transkriptionsfaktoren

In *S. cerevisiae* und anderen Eukaryoten gelten TEA-Transkriptionsfaktoren als Musterbeispiel für die Untersuchung von kombinatorischer und promotorspezifischer Zielgenkontrolle (Madhani & Fink, 1997; Köhler *et al.*, 2002; Zeitlinger *et al.*, 2003; Brückner *et al.*, 2004; Borneman *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009; Heise *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010; Varelas & Wrana, 2012).

Die von Pilzen bis zum Menschen konservierte DNA-Bindedomäne dieser Transkriptionsfaktor-Familie wird als TEA-Domäne bezeichnet. Die Abkürzung "TEA" setzt sich zusammen aus TEF-1, Tec1 und AbaA, homologe TEA-Proteine in

Homo sapiens, *S. cerevisiae* und *Aspergillus nidulans*. Eine weitere Abkürzung, "ATTS" (AbaA, TEF-1, Tec1, Scalloped) impliziert noch ein TEA-Protein aus *Drosophila melanogaster*, wird aber seltener verwendet (Andrianopoulos & Timberlake, 1991; Bürglin, 1991). TEA-Transkriptionsfaktoren kontrollieren die zelluläre Differenzierung und verschiedene Entwicklungsprozesse (Abb. 1.7).

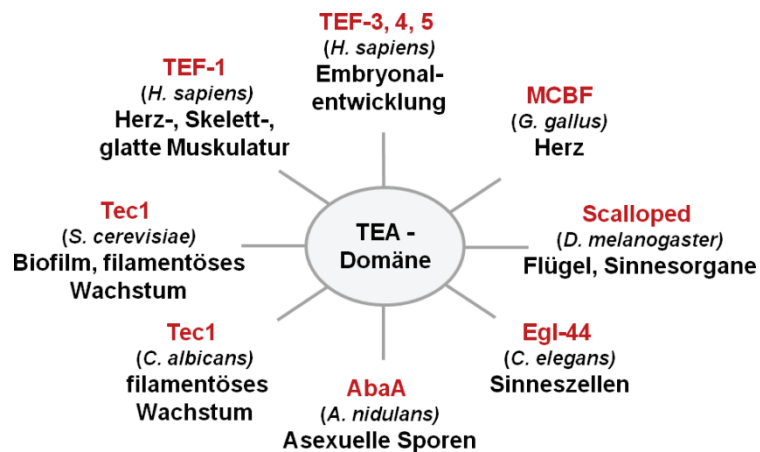


Abb. 1.7: Die Familie der TEA-Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren mit der von Pilzen bis zum Menschen konservierten TEA-DNA-Bindedomäne sind an der Regulation von Differenzierungsvorgängen beteiligt. Aufgelistet sind TEA-Proteine aus verschiedenen Modellorganismen und ihre Funktion. Modifiziert nach Anbanandam *et al.*, 2006.

Tec1 aus *S. cerevisiae* ist an der Regulation der Biofilmbildung bzw. des filamentösen Wachstums beteiligt (Gavrias *et al.*, 1996). Oft spielen TEA-Faktoren auch eine Rolle bei der Expression von viralen Genen. Tec1 aus *S. cerevisiae* wurde ursprünglich als Aktivator der *Ty1*-Retrotransposon-Expression und *Ty1*-vermittelter Transkriptionsaktivierung identifiziert. Tec1 steht für "transposon enhancenment control" (Laloux *et al.*, 1990). Tec1 aus *C. albicans* ist ebenfalls an der Regulation des filamentösen Wachstums beteiligt (Schweizer *et al.*, 2000). Im Schimmelpilz *A. nidulans* wird AbaA bei der asexuellen Sporenbildung benötigt (Mirabito *et al.*, 1989). Egl-44 aus *C. elegans* kontrolliert die Differenzierung von Sinneszellen (Wu *et al.*, 2001). In *D. melanogaster* ist Scalloped an der Flügel- und Sinnesorganentwicklung beteiligt (Halder *et al.*, 1998). MCBF aus dem Huhn *Gallus gallus* ist für die Entwicklung des Herzens zuständig (Farrance *et al.*, 1992). In *H. sapiens* und weiteren höheren Eukaryoten wie der Maus *Mus musculus* und *G. gallus* wurden bisher 4 TEA-Faktoren identifiziert: TEF-1, TEF-3, TEF-4 und TEF-5. TEF-1 ist wichtig für die Muskelentwicklung bei Herz-, Skelett- und auch glatter Muskulatur (Mar & Ordahl, 1990; Farrance & Ordahl, 1996; Hsu *et al.*, 1996). Es kann aber auch die Transkription von Virusgenen wie denen des SV-40-Virus

steuern (Xiao *et al.*, 1991). TEF-3 ist vor allem in Lunge und Leber zu finden. TEF-4 ist für die neuronale Entwicklung von Embryonen notwendig, während TEF-5 in der Plazenta lokalisiert (Jacquemin *et al.*, 1996; Jiang *et al.*, 1999).

In der TEA-DNA-Bindedomäne, die meist 66-68 Aminosäuren umfasst, finden sich zwischen den verschiedenen TEA-Faktoren Sequenzähnlichkeiten von bis zu 95 % (Brückner, 2007). Außerhalb der TEA-Domäne sind sich diese Transkriptionsfaktoren in der Aminosäuresequenz jedoch nicht sehr ähnlich (Anbanandam *et al.*, 2006). Es gibt allerdings funktionelle Überlappungen. So kann beispielsweise die Überexpression von AbaA eine *tec1Δ*-Mutante von *S. cerevisiae* komplementieren (Gavrias *et al.*, 1996).

TEA-DNA-Bindedomänen erkennen und binden kurze, konservierte Sequenzmotive auf der DNA, die als TCS-Elemente ("TEA/ATTS consensus sequence"; Madhani & Fink, 1997), in höheren Eukaryoten auch als M-CAT-Motive ("muscle-CAT") bezeichnet werden. Die TCS-Kernsequenz ist CATTCC bzw. CATTCT, diese wurde in einer neueren Studie mit *S. cerevisiae*-Tec1 auf RMATTCYY erweitert (Madhani & Fink, 1997; Mar & Ordahl, 1988; Heise *et al.*, 2010). Die TEA-Domäne ähnelt strukturell einer Homöodomäne. Homöodomänen bestehen aus 3 Helices, die ein „Helix-Loop-Helix-Turn-Helix“-Motiv aufweisen, das etwa 60 Aminosäuren lang ist. Auch bei den TEA-Transkriptionsfaktoren ist dieses Motiv zu finden, wie die Strukturaufklärung von TEF-1 zeigt. Es gibt bei TEF-1 allerdings kaum Aminosäuresequenzähnlichkeiten zur Homöodomänen-Konsensussequenz und es ist keine funktionelle Komplementation möglich (Anbanandam *et al.*, 2006).

Aus neueren Studien geht hervor, dass die TEA-Faktoren Scalloped aus *Drosophila* und TEF-1-4 aus *Mammalia* als Komponenten eines relativ neu entdeckten Signalweges identifiziert wurden, des Hippo-Signalweges. Als Antwort auf Entwicklungssignale steuert der Hippo-Signalweg Zellproliferation und Apoptose, z.B. bei der Kontrolle von Organgröße und Gewebedifferenzierung. Vermutlich ist er auch an der Tumorbildung bei Krebs beteiligt (Zhao *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2010; Mauviel *et al.*, 2012; Varelas & Wrana, 2012).

1.4.1.1 Die Domänenstruktur von Tec1

Tec1 aus *S. cerevisiae* ist 486 Aminosäuren lang. Die TEA-DNA-Bindedomäne befindet sich zwischen den Aminosäuren 125 und 199 im N-terminalen Bereich des Proteins (Bürglin, 1991) (Abb. 1.8). In der N-terminalen Domäne von Tec1 (Aminosäuren 1-257) liegt außerdem ein Bereich, der für die Transkriptionsaktivierung von Tec1 zusammen mit Ste12 über kombinierte Tec1-Ste12-Bindestellen, so genannte FREs ("filamentation and invasion response elements") (Madhani & Fink, 1997) notwendig und hinreichend ist.

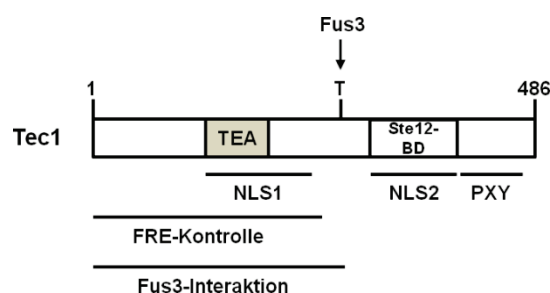


Abb. 1.8: Domänenstruktur von Tec1

Bandenmodell des Transkriptionsfaktors Tec1, der 486 Aminosäuren lang ist. Markiert sind die TEA-DNA-Bindedomäne zwischen den Aminosäuren 125-199 und der Interaktionsbereich für Ste12 zwischen den Aminosäuren 301-400. Die Phosphorylierung durch Fus3 an Threonin 273 unter Pheromoneinwirkung wirkt als Degradierungssignal für den Ubiquitin-vermittelten Abbau von Tec1. Eingezeichnet sind außerdem NLSs, Bereiche für FRE-Kontrolle, Fus3-Interaktion und PxY-Motive, die für die Interaktion mit Rsp5 benötigt werden.

Bei der TCS-vermittelten Genaktivierung wird das gesamte Protein benötigt (Köhler *et al.*, 2002). Der N-Terminus von Tec1 (Aminosäuren 1-280) ist außerdem für die Interaktion mit Fus3 ausreichend (Brückner *et al.*, 2004). Aufgrund der Phosphorylierung durch Fus3 an Threonin 273 wird Tec1 für den Ubiquitin-vermittelten Abbau unter Pheromoneinwirkung markiert, bei dem die Ubiquitinligase SCF^{Cdc4} beteiligt ist (Bao *et al.*, 2004; Brückner *et al.*, 2004; Chou *et al.*, 2004). Eine weitere Phosphorylierungsstelle von Fus3 liegt bei T276 (Bao *et al.*, 2010).

Die Interaktion mit Ste12 erfolgt in der C-terminalen Hälfte des Proteins, zwischen den Aminosäuren 301-400 (Chou *et al.*, 2006). NLSs konnten zwischen den Aminosäuren 125-240 (NLS1) und 301-400 (NLS2) identifiziert werden, wobei NLS2 mit der Ste12-Interaktionsdomäne überlappt, jedoch nicht Ste12-abhängig ist (Kern, 2011). Im C-Terminus von Tec1 (Aminosäuren 406-455) sind zudem drei konservierte PxY-Motive (Prolin-x-Tyrosin) lokalisiert, die am Abbau von Tec1 durch die Ubiquitinligase Rsp5 unter Rapamycin beteiligt sind (Brückner *et al.*, 2011). Die ubiquitinähnliche Sumoylierung an L54 setzt die Fähigkeit von Tec1 zur Transkriptionsaktivierung herab

(Wang & Dohlman, 2006). Hohe Kss1-Aktivität, z. B. bei osmotischem Stress, verringert den Anteil an sumoyliertem Tec1 (Wang *et al.*, 2009). Posttranskriptionell kann die Tec1-Menge durch das RNA-Bindeprotein Mpt5 reguliert werden, das die *TEC1*-mRNA an der 3'-UTR (untranslatierte Region) bindet (Prinz *et al.*, 2007).

1.4.2 Der Transkriptionsfaktor Ste12

Der Transkriptionsfaktor Ste12 aus *S. cerevisiae* gehört zur Gruppe der Ste12-ähnlichen Transkriptionsfaktoren, die vornehmlich in Pilzen zu finden sind. Ste12-ähnliche Transkriptionsfaktoren sind an der Kontrolle von sexueller Differenzierung und Pathogenität beteiligt. Für die Konjugation sind diese Proteine essentiell, da eine Gendelektion Sterilität hervorruft. Daher stammt auch der Name "Ste" ("sterile") (Hoi & Dumas, 2010; Risipail & Di Pietro, 2010). Charakteristisch für Ste12-Proteine ist eine Homöodomäne zur DNA-Bindung im N-terminalen Drittel des Proteins (Yuan & Fields, 1991). Ste12 aus *S. cerevisiae* vermittelt die Transkription von biofilmspezifischen Zielgenen, sowie auch von Zielgenen der Pheromonantwort (Errede & Ammerer, 1989; Gavrias *et al.*, 1996; Madhani & Fink, 1997). In Abwesenheit eines Pheromon- oder Nährstoffsignals liegt Ste12 im Komplex mit Dig1 und Dig2 vor und ist an Kss1 gebunden (Cook *et al.*, 1996; Bardwell *et al.*, 1998a). Bei Aktivierung durch die MAPKs Fus3 und Kss1 bei der Pheromonantwort bindet Ste12 entweder als Homomultimer oder als Heterodimer mit Mcm1 oder MAT α 1 an konjugations-spezifische Zielgene (Hagen *et al.*, 1991; Yuan & Fields, 1991; Yuan *et al.*, 1993; Pi *et al.*, 1997; Olson *et al.*, 2000). Die DNA-Bindesequenz für Ste12 wird als PRE ("pheromone-responsive element") bezeichnet und lautet TGAAACA (Yuan & Fields, 1991; Badis *et al.*, 2008). Verlängerte Pheromonexposition führt zu einem Ubiquitin-vermittelten Abbau von Ste12, der von Far1 abhängig ist (Esch *et al.*, 2006).

1.4.2.1 Die Domänenstruktur von Ste12

Ste12 aus *S. cerevisiae* umfasst 688 Aminosäuren. Die DNA-Bindedomäne von Ste12 liegt zwischen den Aminosäuren 1-215 im N-terminalen Bereich des Proteins (Yuan & Fields, 1991) (Abb. 1.9). Die DNA-Bindedomäne vermittelt auch die Kooperativität zwischen Ste12-Proteinen bei der Bindung an multiple PREs (Yuan & Fields, 1991). Eine Tec1-Interaktionsdomäne konnte ebenfalls im N-terminalen Drittel des Ste12-Proteins determiniert werden (Chou *et al.*, 2006). Hier liegt auch der Interaktionsbereich

für Dig2, während der für Dig1 in der mittleren Region von Ste12 liegt (Aminosäuren 309-547) (Olson *et al.*, 2000). Die Interaktion mit Kss1 erfolgt im Bereich der Aminosäuren 298-473 (Bardwell *et al.*, 1998b). Die Interaktion mit Mcm1 findet im Ste12-C-Terminus zwischen den Aminosäuren 470-688 statt (Errede & Ammerer, 1989; Primig *et al.*, 1991).

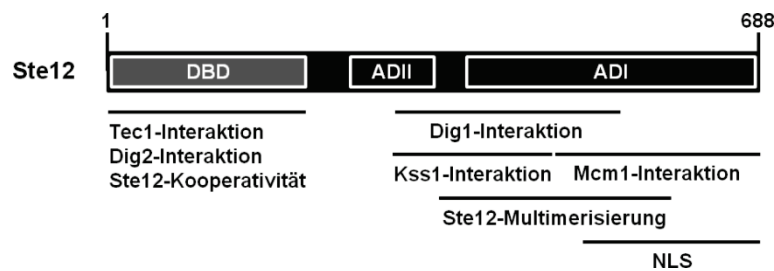


Abb. 1.9: Domänenstruktur von Ste12

Bandenmodell des Transkriptionsfaktors Ste12, der 688 Aminosäuren umfasst. Markiert sind die DNA-Bindedomäne zwischen den Aminosäuren 1-215 und die beiden Aktivierungsdomänen zwischen den Aminosäuren 380-688 (ADI) und zwischen den Aminosäuren 255-354 (ADII). Hervorgehoben sind außerdem Regionen für die Interaktion mit Tec1, Dig1, Dig2, Kss1 und Mcm1 und Bereiche für Ste12-Kooperativität bei der Bindung an multiple PREs und für die Bildung von Ste12-Multimeren.

Im Bereich der Aminosäuren 356-594 wird eine Region vermutet, die die Multimerisierung von Ste12-Proteinen vermittelt (Olson *et al.*, 2000). Ebenfalls im C-Terminus, zwischen den Aminosäuren 494-688, wurde eine NLS gefunden (Leslie *et al.*, 2002). Die Fähigkeit zur Transkriptionsaktivierung zeigen zwei Regionen von Ste12. Im C-Terminus, zwischen den Aminosäuren 380-688, lokalisiert Aktivierungsdomäne I (ADI) (Kirkman-Correia *et al.*, 1993). Im mittleren Bereich des Proteins, zwischen den Aminosäuren 255-354, liegt eine pheromonabhängige Aktivierungsdomäne (ADII) (Pi *et al.*, 1997).

1.4.3 Mechanismen der Tec1-Ste12-Zielgenkontrolle

Bei der kombinatorischen Zielgenkontrolle bilden Tec1 und Ste12 einen Komplex über den C-Terminus von Tec1 (Chou *et al.*, 2006). Das Tec1-Ste12-Heterodimer kann an kombinierte Tec1-Ste12-Bindestellen (FREs) binden (Abb. 1.10) (Madhani & Fink, 1997). Auch TCS-Elemente werden von Tec1-Ste12-Komplexen gebunden (Köhler *et al.*, 2002; Chou *et al.*, 2006).

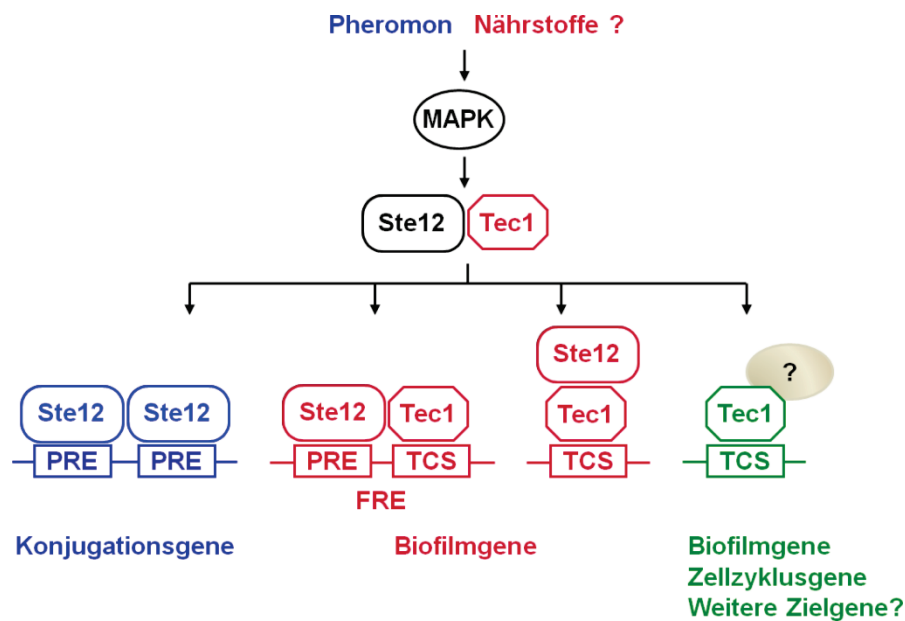


Abb. 1.10: Mechanismen der Tec1-Ste12-Zielgenkontrolle

Der Transkriptionsfaktor Ste12 kann pheromonabhängig als Multimer an PREs in den Promotorregionen von Konjugationsgenen binden. Bei der Regulation biofilmspezifischer Zielgene können Tec1 und Ste12 kooperativ an FRES binden oder an einzelne TCS-Elemente. Biofilmgene, Zellzyklusgene und weitere Zielgene von Tec1 enthalten häufig einzelne oder multiple TCS-Elemente. Vermutlich gibt es eine Ste12-unabhängige Zielgenregulation durch Tec1, die möglicherweise die Interaktion von Tec1 mit weiteren Faktoren einschließt.

FRES wurden bisher nur in der regulatorischen Sequenz des *Ty1*-Elements, im *TEC1*-Promotor und im *FLO11*-Promotor gefunden. Das *Ty1*-FRE enthält ein TCS-Element und ein PRE mit einem Abstand von 14 bp. Im *TEC1*-FRE sind die Ste12- und Tec1-Bindestellen oppositionell orientiert und haben einen Abstand von nur 4 bp (Madhani & Fink, 1997). Beim FRE im *FLO11*-Promotor sind TCS und PRE wie bei *Ty1* durch 14 bp voneinander getrennt, allerdings unterscheidet sich die Sequenz des PREs in einer Base von der Konsensussequenz (TGCAACA statt TGAAACA) (Lo & Dranginis, 1998). Dieses PRE ist nicht konserviert zwischen anderen Hefe-Spezies (Chou *et al.*, 2006). Zudem liegt das *FLO11*-FRE in einer URS ("upstream repression sequence"), sodass es keine Aktivierung eines *lacZ*-Reportergens, das diese URS enthält, vermitteln kann (Rupp *et al.*, 1999). Eine gemeinsame Bindung von *FLO11* durch Tec1 und Ste12 konnte bisher nicht nachgewiesen werden (Zeitlinger *et al.*, 2003).

Tec1 und Ste12 werden jedoch oft zusammen an Promotoren von anderen biofilmspezifischen Zielgenen wie *PGU1*, *SHO1*, *MSB2* oder auch *TEC1* gefunden (Borneman *et al.*, 2006, 2007; Zeitlinger *et al.*, 2003). Viele Tec1-Ste12-Zielgene enthalten allerdings keine PREs, sondern ein oder mehrere TCS-Elemente (Chou *et al.*, 2006; Heise *et al.*, 2010). Daher wurde bisher angenommen, dass bei diesen Genen Tec1 für die DNA-Bindung benötigt wird, während Ste12 die Transkriptionsaktivierung

vermittelt (Abb. 1.10). Auch für *FLO11* wird dieser Regulationsmechanismus vermutet (Chou *et al.*, 2006). Es gibt jedoch Hinweise, dass die Tec1-gesteuerte Zielgenaktivierung auch ohne Ste12 möglich ist. Beispielsweise kann AbaA, wenn es heterolog in *S. cerevisiae* exprimiert wird, die Transkription von Biofilmgene in Abwesenheit von Ste12 aktivieren (Gavrias *et al.*, 1996). Auch TCS- und FRE-getriebene Reportergene können ohne Ste12 durch Tec1-Überexpression aktiviert werden (Köhler *et al.*, 2002).

Bei Konjugationsgenen, die durch Ste12-Mcm1-Komplexe reguliert werden, vermittelt Mcm1 die DNA-Bindung des Komplexes an ein P-Box-Element, während Ste12 für die Transkriptionsaktivierung zuständig ist (Errede & Ammerer, 1989; Primig *et al.*, 1991; Yuan *et al.*, 1993). Bei α -spezifischen Genen bindet MAT α 1 an Q-Box-Elemente und rekrutiert Mcm1 und Ste12 an die DNA, die dann die Transkriptionsaktivierung vermitteln (Bender & Sprague, 1987; Primig *et al.*, 1991). Die Regulation konjugations-spezifischer Zielgene wie *FUS1*, *AGA1* oder *FIG2* durch Ste12-Multimere erfolgt über multiple PREs (Abb. 1.10) (Yuan & Fields, 1991; Hagen *et al.*, 1991; Chou *et al.*, 2006; Su *et al.*, 2010). PREs wurden auch im *TEC1*-Promotor gefunden. So kann Ste12 unter Pheromoneinwirkung die *TEC1*-Transkription verstärken (Oehlen & Cross, 1998; Köhler *et al.*, 2002). Unter vegetativen Bedingungen bei guter Nährstoffversorgung kann Tec1 die *TEC1*-Transkriptionsrate über das FRE und weitere TCS-Elemente autoregulatorisch erhöhen (Madhani & Fink, 1997; Oehlen & Cross, 1998).

Obwohl sich bereits viele Studien mit der Untersuchung der Tec1-Ste12-Zielgenkontrolle beschäftigt haben, sind die genauen molekularen Mechanismen der promotorspezifischen Regulation durch Tec1 und Ste12 nur ansatzweise aufgeklärt. Auch das Verständnis der physiologischen Bedeutung der Tec1-Ste12-Interaktion auf Proteinebene ist noch nicht vollständig. Aus diesem Grund bedarf die mögliche Beteiligung weiterer Faktoren ebenfalls weiterer Untersuchung.

1.5 Ziele dieser Arbeit

Eine zentrale Frage dieser Arbeit war es, welche Kombinationen von Transkriptionsfaktoren *S. cerevisiae*-Zellen bei der Regulation von Wachstum und Differenzierung benutzen. Diese Arbeit stellt exemplarisch die kombinatorische Kontrolle der Transkriptionsfaktoren Tec1 und Ste12 in den Fokus, die am Ende des Fus3/Kss1-MAPK-Signalweges stehen und die für die Ausführung der Differenzierungsprogramme Biofilmbildung und Konjugation benötigt werden. Hierzu gehören die Interaktionen von Tec1 und Ste12 mit weiteren Regulatoren, die promotorspezifische Kontrolle ihrer Zielgene und die Verbindung zu weiteren regulatorischen Netzwerken. Schließlich sollte die Dynamik der Transkriptionsregulation im Fus3/Kss1-MAPK-Modul in lebenden Zellen quantitativ untersucht werden, um ein besseres Verständnis der Koordination von Wachstum und Differenzierung in biologischen Systemen zu erhalten.

Spezifisch sollten die folgenden drei Fragen beantwortet werden:

1. Welche Funktion hat die Tec1-Ste12-Komplexbildung *in vivo*?
2. Gibt es weitere Regulatoren, die zusammen mit Tec1 Zielgenkontrolle ausüben können und wenn ja, welche physiologische Rolle haben diese neuen Komplexe?
3. Ist es möglich, die Dynamik des Fus3/Kss1-MAPK-Moduls *in vivo* auf Einzelzellebene zu untersuchen?

2 Ergebnisse

2.1 Tec1 vermittelt promotorspezifische Genregulation durch Ste12-abhängige und Ste12-unabhängige Mechanismen

2.1.1 Tec1 aktiviert Ste12-unabhängig TCS-vermittelte Genexpression und *FLO11*-vermittelte Biofilmbildung

Da die Transkriptionsfaktoren Tec1 und Ste12 funktionell sehr eng verknüpft sind, nahm man zunächst an, dass die TCS-vermittelte Genexpression nur von Tec1-Ste12-Komplexen aktiviert werden kann. Es gab jedoch Hinweise, dass Tec1 in der Lage ist, Ste12-unabhängige Funktionen zu übernehmen, da Tec1 auch in *ste12Δ*-Stämmen TCS-getriebene Reportergene aktivieren kann (Köhler *et al.*, 2002). Hierfür war allerdings eine Überexpression von Tec1 nötig, da die *TEC1*-Transkription stark von Ste12 abhängig ist (Oehlen & Cross, 1998). Um dieses Problem zu umgehen und um genauere *in-vivo*-Messungen durchführen zu können, wurden Hefestämme hergestellt, in denen eine einzelne genomische Kopie von *TEC1* unter Kontrolle des Ste12-unabhängigen *URA3*-Promotors ist. Mit Hilfe von Tec1-spezifischen Antikörpern konnte im Immunoblot gezeigt werden, dass die Tec1-Menge im einem *S. cerevisiae*-Stamm mit *URA3(P)-TEC1* und *STE12* ähnlich der eines Stammes mit *TEC1(P)-TEC1* und *STE12* ist (Abb. 2.1A, Daten erhoben von B. Heise). In Hefestämmen, in denen *STE12* deletiert ist, nimmt mit *TEC1(P)-TEC1* die Tec1-Menge um mehr als das 14-fache ab, während sie mit *URA3(P)-TEC1* nur um das 2-fache abnimmt.

In den Stämmen mit *URA3(P)-TEC1* wurde dann die Tec1-abhängige Aktivierung von TCS- und FRE-getriebenen *lacZ*-Reportergenen mittels β -Galaktosidasetests gemessen. Die erhaltenen Werte wurden zu den im Immunoblot bestimmten Tec1-Proteinmengen der Stämme relativiert. Erste TCS-*lacZ*-Messungen wurden in einer vorhergehenden Arbeit durchgeführt (van der Felden, 2008), diese Daten wurden in der vorliegenden Arbeit durch weitere TCS- und FRE-*lacZ*-Messungen ergänzt (Abb. 2.1A).

Die TCS-*lacZ*-Messungen zeigen, dass die An- oder Abwesenheit von Ste12 keinen Einfluss auf die Tec1-vermittelte relative TCS-Aktivierung hat. Auch der FRE-Reporter kann durch Tec1 sogar in Abwesenheit von Ste12 aktiviert werden (Abb. 2.1A, vergleiche *tec1Δ* mit *URA3(P)-TEC1*).

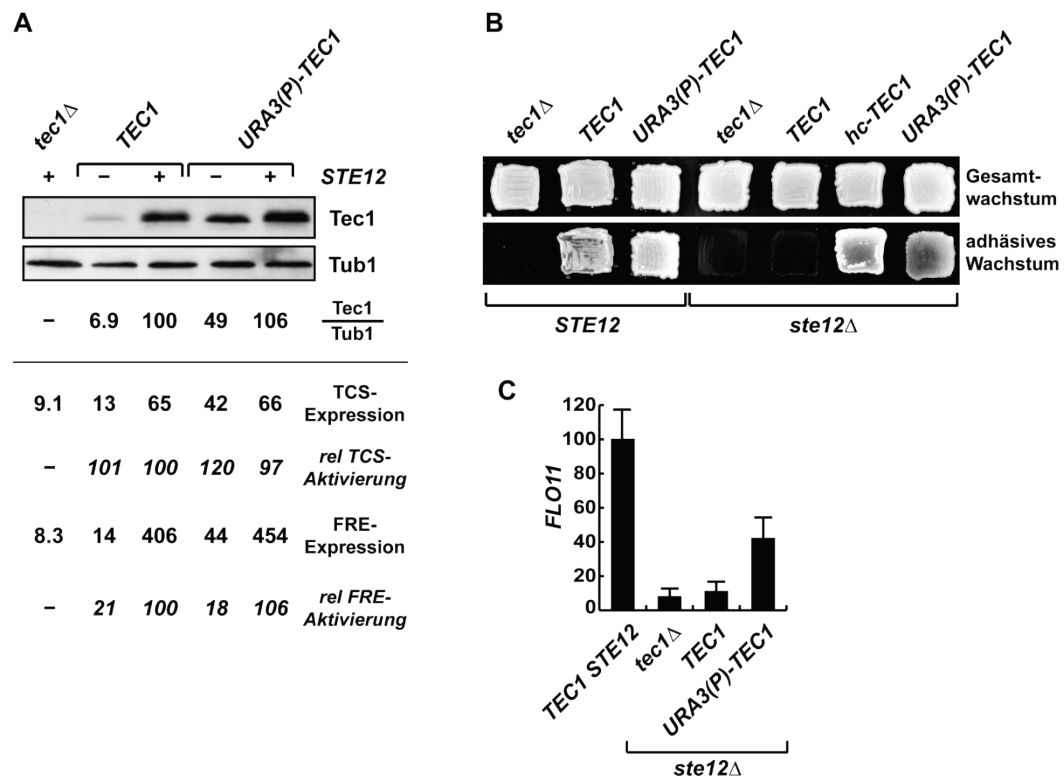


Abb. 2.1: Aktivierung von TCS- und FRE-getriebenen Reportergenen und *FLO11*-abhängiger Adhäsion durch Tec1 in An- und Abwesenheit von Ste12

A) TCS- und FRE-Reportergenexpression, bestimmt durch Messung der β -Galaktosidase-Aktivitäten in Hefestämmen mit *STE12* oder *ste12Δ*, die entweder kein *TEC1* (*tec1Δ*) exprimieren, oder einzelne genomische Kopien von *TEC1(P)-TEC1* oder *URA3(P)-TEC1* und integrierte TCS- oder FRE-*CYC1-lacZ*-Reportergene tragen. Die Tec1-Mengen wurden durch quantitatives Immunoblotting mit Tec1-spezifischen Antikörpern und mit Tub1 als internem Standard bestimmt und sind jeweils angegeben als Prozentsatz der Tec1-Menge in einem Kontrollstamm mit *TEC1* und *STE12*. Die Reportergenaktivierung (kursiv) wurde für die Tec1-Mengen in den entsprechenden Hefestämmen korrigiert. **B)** Adhäsives Wachstum der Hefestämme mit den angegebenen Genotypen nach Wachstum auf SC-Agar. Die Platten wurden vor (Gesamtwachstum) und nach (adhäsives Wachstum) Entfernung der nicht-adhäsiven Zellen durch einen Waschtest fotografiert. Für die Überexpression von *TEC1* wurde das Plasmid BHUM30 verwendet, alle anderen Stämme trugen das Leerplasmid YEplac195. **C)** *FLO11*-Expression in Hefestämmen mit den angegebenen Genotypen, bestimmt durch quantitative Realtime-PCR. Die Höhe der Expression ist angegeben als Prozentsatz der Expression in einem *TEC1 STE12*-Kontrollstamm. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die Abbildung stammt aus Heise *et al.*, 2010.

Außerdem ist die Stärke der Tec1-abhängigen relativen FRE-Aktivierung vergleichbar mit der des TCS-Reporters. Jedoch kann die FRE-Aktivierung durch die Anwesenheit von Ste12 noch weiter gesteigert werden, was auf eine kooperative Bindung von Tec1 und Ste12 an das FRE hindeutet. Insgesamt zeigen die hier ermittelten Daten, dass sich die Funktionen von Tec1 am TCS- und am FRE-Reporter nicht maßgeblich unterscheiden.

Um die Auswirkungen der unterschiedlichen Tec1-Mengen in Stämmen mit *TEC1(P)-TEC1* und *URA3(P)-TEC1* in An- und Abwesenheit von Ste12 zu messen, wurden das adhäsive Wachstum und die *FLO11*-Expression untersucht. Erwartungsgemäß zeigen Hefestämme mit *TEC1(P)-TEC1* adhäsives Wachstum in Anwesenheit von Ste12, aber

nicht in Abwesenheit von Ste12 (Abb. 2.1B). Im Gegensatz dazu vermittelt *URA3(P)-TEC1* auch im *ste12Δ*-Hintergrund adhäsives Wachstum. Allerdings ist die Adhäsion dieses Stammes nicht so stark wie die eines Stammes mit *STE12* oder mit überexprimiertem *TEC1* auf einem "high copy"-Plasmid (*hc-TEC1*). In Korrelation mit diesen Ergebnissen zeigt eine quantitative Realtime-PCR, dass Tec1 die *FLO11*-Expression auch in Abwesenheit von Ste12 aktivieren kann (Abb. 2.1C) und dass die Stärke der *FLO11*-Aktivierung mit der Tec1-Menge korreliert. Die TCS-vermittelte Genexpression durch Tec1 kann also auch ohne Ste12 erfolgen. Die hier erzielten Ergebnisse bedeuten, dass Tec1 *in vivo* Ste12-unabhängig an TCS-Elemente binden kann. Dieser Befund wurde *in vitro* durch quantitative Gelretardierungsexperimente bestätigt, in denen Tec1 Ste12-unabhängig effizient an TCS-Elemente mit der Konsensussequenz RMATTCYY bindet (Heise *et al.*, 2010, Daten erhoben von B. Heise). Zudem erhöht Ste12 nicht die Affinität von Tec1 zum TCS, umgekehrt verstärkt Tec1 auch nicht die Ste12-PRE-Interaktion (van der Felden, 2008; Heise *et al.*, 2010). Ergänzend hierzu konnte gezeigt werden, dass konservierte Aminosäuren in der TEA-DNA-Bindedomäne von Tec1 für die TCS-abhängige Genexpression nötig sind, und dass diese auch die Kernlokalisierung von Tec1 maßgeblich beeinflussen (Heise *et al.*, 2010; Kern, 2011).

2.1.2 Die C-terminale Domäne von Tec1 vermittelt Ste12-unabhängige Transkriptionsaktivierung

Vorhergehende Versuche haben gezeigt, dass partielle Deletionen des C-Terminus von Tec1 zu einem Verlust der TCS-vermittelten Genexpression führen (Köhler *et al.*, 2002). Aus diesem Grund wurde der Einfluss der C-terminalen Domäne von Tec1 auf die Transkriptionsaktivierung von Reportergenen näher charakterisiert. Die verwendeten Konstrukte sind in Abb. 2.2 dargestellt.

Bei einem Tec1-Fragment, dem der C-terminale Bereich und somit auch die Ste12-Interaktionsdomäne fehlt (*URA3(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰*), ist die relative Transkriptionsaktivierung sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Ste12 deutlich um mehr als 90 % reduziert (Abb. 2.3A). Der Immunoblot in Abb. 2.3A wurde in van der Felden, 2008 erstellt, die Daten der TCS-*lacZ*-Reportergenmessungen aus derselben Arbeit wurden in der vorliegenden Dissertation ergänzt und durch FRE-Analysen erweitert.

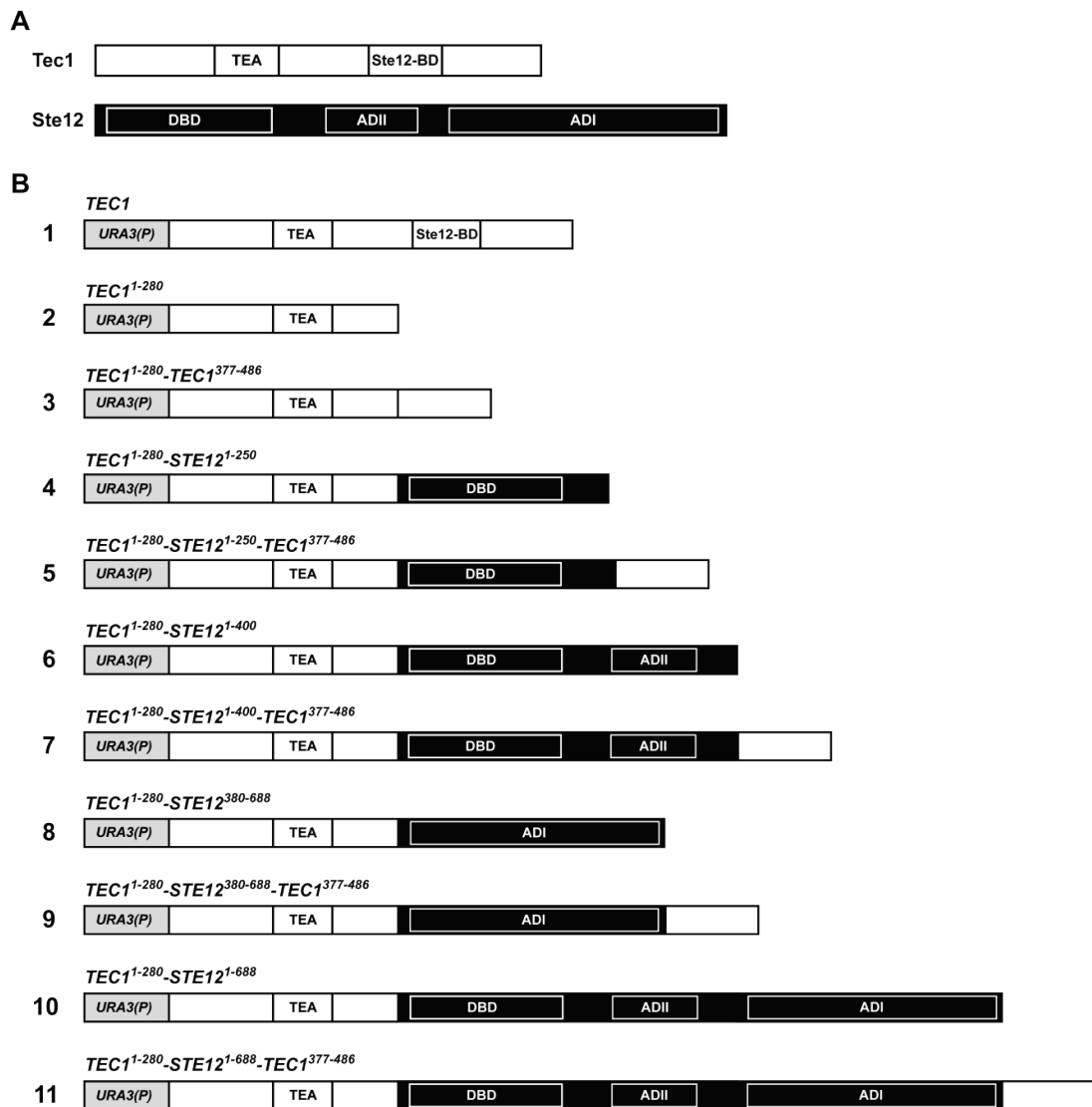


Abb.2.2: Domänenstrukturen von Tec1, Ste12 und *URA3(P)*-getriebener *TEC1-STE12*-Hybridkonstrukte

A) Domänenstrukturen von Tec1 mit TEA-DNA-Bindedomäne und Ste12-Interaktionsdomäne und von Ste12 mit DNA-Bindedomäne (DBD) und Aktivierungsdomänen (ADI und ADII). **B)** Schematische Darstellung der *URA3(P)*-getriebenen *TEC1-STE12*-Hybridkonstrukte. Codierte Aminosäuren und Tec1/Ste12-Domänen sind angegeben. Die Abbildung stammt aus Heise *et al.*, 2010.

Die Fusion von Tec1³⁷⁷⁻⁴⁸⁶ an Tec1¹⁻²⁸⁰ führt zu einer signifikanten, wenn auch nicht vollständigen Wiederherstellung der Transkriptionsaktivierung. Dabei macht die An- oder Abwesenheit von Ste12 keinen Unterschied (Abb. 2.3A). Die Daten deuten darauf hin, dass die C-terminale Domäne von Tec1 eine Ste12-unabhängige Transkriptionsaktivierungsdomäne enthält. Unabhängig davon zeigt auch eine "Yeast One-Hybrid"-Analyse mit einem *lexA*-basierten System (Golemis & Brent, 1992), dass eine Fusion der *lexA*-DNA-Bindedomäne mit C-terminalen Fragmenten von Tec1 (Tec1²⁸¹⁻⁴⁸⁶ und Tec1³⁵⁰⁻⁴⁸⁶) im Vergleich zu *lexA* allein zu einer signifikanten Stimulation der *lexAop*-getriebenen *lacZ*-Reportergenaktivierung führt (Abb. 2.3B).

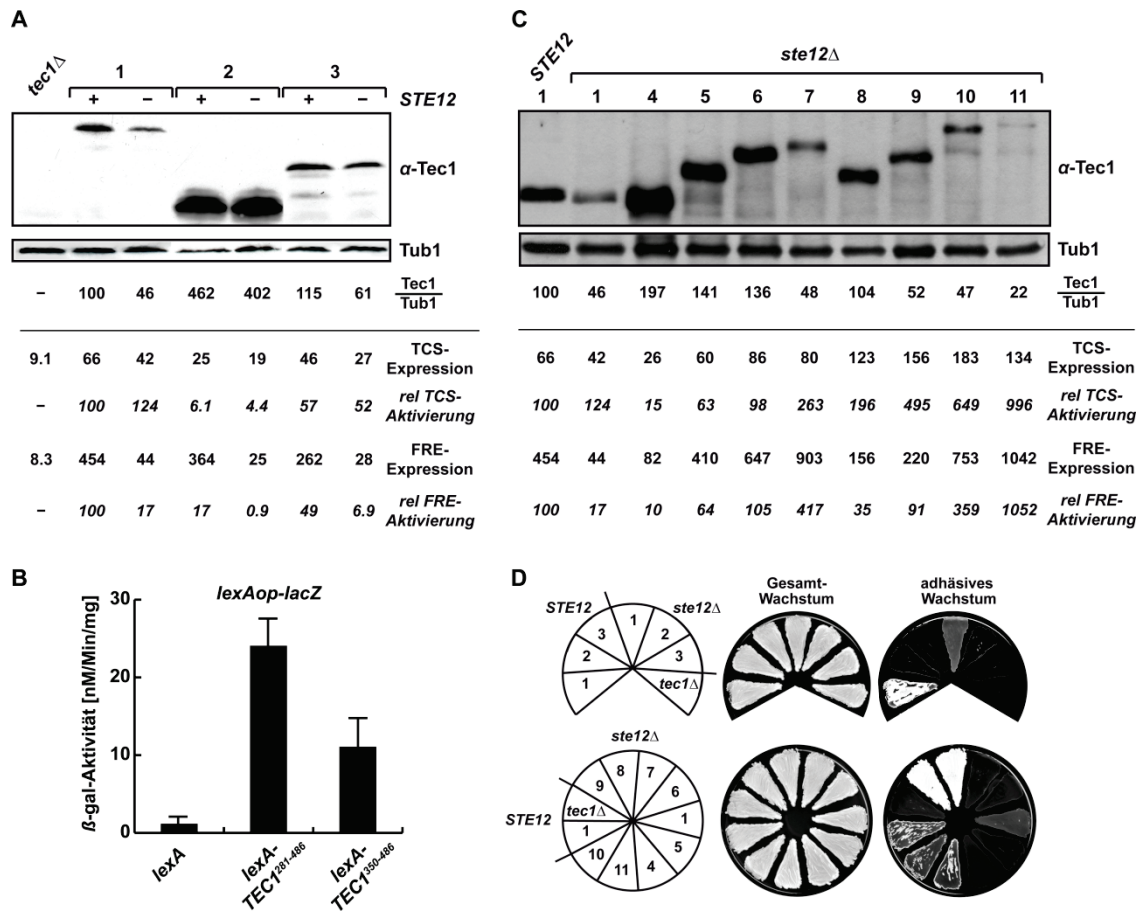


Abb. 2.3: Transkriptionsaktivierung verschiedener Tec1- und Ste12-Proteine

A) Relative Aktivierung von TCS- und FRE-*lacZ*-Reportergenen durch Tec1 (Konstrukt 1), Tec1¹⁻²⁸⁰ (Konstrukt 2) und Tec1¹⁻²⁸⁰-Tec1³⁷⁷⁻⁴⁸⁶ (Konstrukt 3), bestimmt in Hefestämmen mit *STE12* oder *ste12Δ*, die *TEC1*-Varianten und TCS- oder FRE-*CYC1-lacZ*-Reportergene von einzelnen genomischen Kopien aus exprimieren. **B)** Aktivierung eines *lexAop-lacZ*-Reportergens durch *lexA* (pEG202), *lexA-TEC1*²⁸¹⁻⁴⁸⁶ (BHUM752) und *lexA-TEC1*³⁵⁰⁻⁴⁸⁶ (BHUM1687), im Hefestamm EGY48-p1840, der auch Plasmid pJG4-5 trägt. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. **C)** Relative Aktivierung von TCS- und FRE-*lacZ*-Reportergenen durch Tec1-Ste12-Hybridproteine, bestimmt in *tec1Δ ste12Δ*-Stämmen, die die *TEC1-STE12*-Hybride und TCS- oder FRE-*CYC1-lacZ*-Reportergene von einzelnen genomischen Kopien aus exprimieren. **D)** Adhäsives Wachstum der Hefestämme aus A und C nach Wachstum auf YPD. Die Platten wurden vor (Gesamtwachstum) und nach (adhäsives Wachstum) Entfernung der nicht-adhäsiven Zellen durch einen Waschtest fotografiert. Die Abbildung stammt aus Heise *et al.*, 2010. D wurde in van der Felden, 2008 erstellt.

2.1.3 Die C-terminale Domäne von Tec1 kann durch eine Aktivierungsdomäne von Ste12 ersetzt werden

Als Nächstes stellte sich die Frage, ob die C-terminale Domäne von Tec1 durch Ste12, den Aktivierungsdomänen oder der DNA-Bindedomäne von Ste12 ersetzt werden kann, indem die Tec1-TEA-Domäne mit den Ste12-Fragmenten fusioniert wird. Daher wurden verschiedene *TEC1*¹⁻²⁸⁰-*STE12*-Hybridkonstrukte erstellt (Abb. 2.2B) und ihre Fähigkeit zur Aktivierung von TCS- und FRE-getriebenen Reportergenen und des adhäsiven Wachstums untersucht (Abb. 2.3CD). *S. cerevisiae*-Stämme, die einzelne genomische Kopien dieser Hybridkonstrukte exprimieren, wurden in van der Felden,

2008 hergestellt. Erste Bestimmungen der Fusionsproteinmengen, initiale TCS-*lacZ*-Messungen und der Waschtest (Abb. 2.3D) wurden ebenfalls in van der Felden 2008 durchgeführt, der maßgebliche Teil der Abb. 2.3C zugrundeliegenden Daten wurde jedoch während der vorliegenden Arbeit erhoben.

Eine Fusion von Tec1¹⁻²⁸⁰ mit der DNA-Bindedomäne von Ste12 (Ste12¹⁻²⁵⁰) kann keine effiziente TCS-*lacZ*-Reporterergenaktivierung vermitteln (Abb. 2.3C, Konstrukt 4). Hybridproteine mit Ste12-ADI oder Ste12-ADII können jedoch eine signifikante Aktivierung des TCS-Reporters vermitteln (Abb. 2.3C, Konstrukte 6 und 8). Der stärkste Effekt wird mit einer Fusion mit vollständigem Ste12 erreicht. Die TCS-Aktivierung kann mehr als 6-fach im Vergleich zu Tec1 gesteigert werden (Abb. 2.3C, Konstrukt 10).

An alle Tec1-Ste12-Hybridkonstrukte wurden zusätzlich die C-terminalen Aminosäuren von Tec1, Aminosäuren 377-486, fusioniert (Abb. 2.3C, Konstrukte 5, 7, 9, 11), was jeweils zu einer deutlichen Zunahme der TCS-*lacZ*-Aktivierung im Vergleich zu Konstrukten ohne Tec1³⁷⁷⁻⁴⁸⁵ führte. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass Tec1³⁷⁷⁻⁴⁸⁶ eine Aktivierungsdomäne trägt. Auch beim FRE-Reporter ist eine starke Induktion der Transkription bei einer Fusion von Tec1¹⁻²⁸⁰ mit Ste12-ADI, Ste12-ADII oder vollständigem Ste12 zu verzeichnen. Interessanterweise führte die Insertion der Ste12-DNA-Bindedomäne zwischen Tec1¹⁻²⁸⁰ und Tec1³⁷⁷⁻⁴⁸⁶ zu einer 9,1-fachen Induktion der FRE-Expression (Abb. 2.3A, Konstrukt 3 und Abb. 2.3C, Konstrukt 5). Vermutlich kann dieses Konstrukt ähnlich wie das Tec1-Ste12-Heterodimer beide Bindestellen im FRE besetzen.

Die Aktivierung des *FLO11*-abhängigen adhäsiven Wachstums (Abb. 2.3D) korreliert nicht vollständig mit der TCS- und FRE-Reporterergenaktivierung. Fusionen mit Ste12-ADII scheinen sogar die Aktivierung des adhäsiven Wachstums zu unterdrücken (Abb. 2.3D, Konstrukte 6 und 7). Die TCS-Aktivierung dieses Konstrukts ist aber vergleichsweise stark, daher scheinen weitere Sequenzelemente oder DNA-Bindeproteine seine Aktivität am *FLO11*-Promotor zu beeinflussen. Fusionen mit Ste12-ADI oder vollständigem Ste12 konnten die Adhäsion stark induzieren, ähnlich wie die Reporterergenaktivierung (Abb. 2.3D, Konstrukte 8, 9, 10, 11). Bei der *FLO11*-vermittelten Adhäsion ist Ste12-ADI also besonders wichtig.

Ergänzend dazu wurde während der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Dig1 auf die Tec1-abhängige TCS-Aktivierung in An- und Abwesenheit von Ste12 bestimmt (Abb. 2.4).

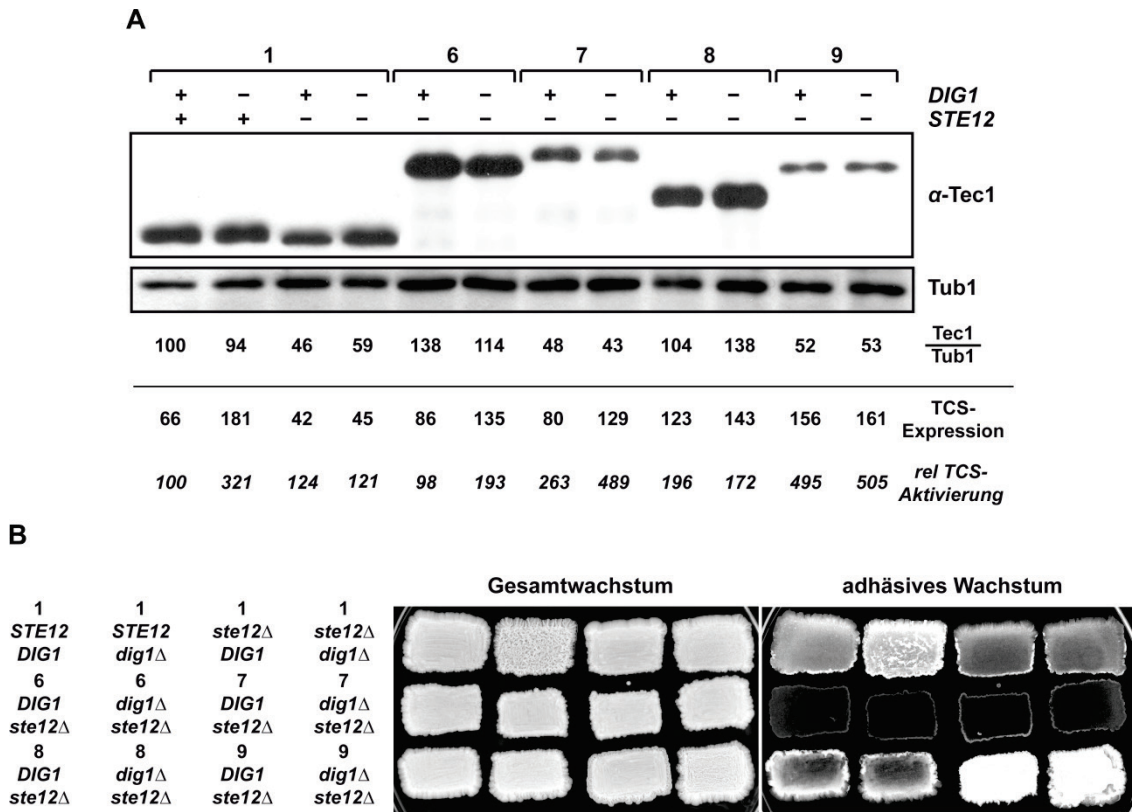


Abb. 2.4: Dig1-abhängige Transkriptionsaktivierung von Tec1-Ste12-Fusionsproteinen
A) Relative Aktivierung von TCS-*lacZ*-Reportergen, bestimmt in *tec1 Δ* -Stämmen mit den angegebenen *DIG1*- und *STE12*-Genotypen, die *URA3(P)*-getriebenes *TEC1* (Konstrukt 1) oder verschiedene *TEC1-STE12*-Konstrukte (Konstrukte 6, 7, 8, 9 aus Abb. 2.2B) von einzelnen genomischen Kopien aus exprimieren. B) Adhäsives Wachstum der in A beschriebenen Hefestämme nach Wachstum auf YPD-Agar. Die Platten wurden vor (Gesamtwachstum) und nach (adhäsives Wachstum) Entfernung der nicht-adhäsiven Zellen durch einen Waschtest fotografiert. Die Abbildung stammt aus Heise *et al.*, 2010.

Erwartungsgemäß werden TCS-Aktivierung und Adhäsion durch Dig1 negativ reguliert (Abb. 2.4, Konstrukt 1). Die Ste12-unabhängige TCS- und Adhäsionsaktivierung von Tec1 wird durch Dig1 nicht beeinflusst. Außerdem zeigt sich ein negativer Effekt von Dig1 auf die TCS-Aktivierung bei Fusionen mit Ste12-ADII (Abb. 2.4, Konstrukte 6 und 7), aber nicht bei Fusionen mit Ste12-ADI (Abb. 2.4, Konstrukte 8 und 9). Dig1 inhibiert Ste12 also über ADII von Ste12.

Insgesamt zeigen die Resultate dieses Abschnitts, dass die C-terminale Domäne von Tec1, die ein Ste12-unabhängige Transkriptionsaktivierung vermittelt, durch eine Aktivierungsdomäne von Ste12 ersetzt werden kann.

2.1.4 Ste12-abhängige und Ste12-unabhängige Zielgene von Tec1 lassen sich in zwei Klassen einteilen

Die *S. cerevisiae*-Stämme, die *TEC1* Ste12-unabhängig vom *URA3(P)*-Promotor aus exprimieren, ermöglichen erstmals die genomweite Analyse der Tec1-abhängigen Genexpression in Abwesenheit von Ste12. Daher wurden Transkriptprofile von Hefestämmen mit *TEC1 STE12*, *tec1Δ STE12*, *URA3(P)-TEC1 ste12Δ* und *tec1Δ ste12Δ* unter Verwendung von GeneChip® Yeast Genome 2.0 Arrays (Affymetrix) erstellt (Heise *et al.*, 2010; Daten erhoben von B. Heise und M. Malcher).

289 Gene sind mindestens um einen Faktor von 1,5 durch Tec1 in Anwesenheit von Ste12 reguliert, während 48 Gene durch Tec1 in Abwesenheit von Ste12 reguliert sind (Abb. 2.5A). 35 dieser Gene sind in beiden Gruppen vorhanden.

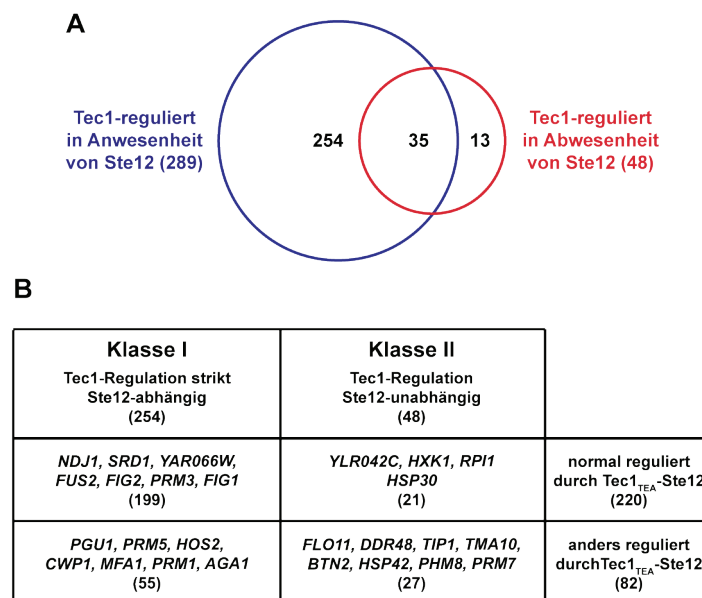


Abb. 2.5: Klassifizierung von Tec1-regulierten Genen durch genomweite Transkriptanalysen

A) Das Venn-Diagramm gibt die Zahl der Gene an, deren Expression mindestens um den Faktor 1,5 verändert war, beim Vergleich der Hefestämme YHUM1694 (*TEC1 STE12*) und YHUM1700 (*tec1Δ STE12*) (blau) oder YHUM1676 (*URA3(P)-TEC1 tec1Δ*) und YHUM1701 (*tec1Δ ste12Δ*) (rot). Die Zahl der gemeinsam regulierten Gene ist ebenfalls angegeben. **B)** Klassifizierung der 302 hier identifizierten Tec1-regulierten Gene. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahlen der Gene in den entsprechenden Klassen an. Die Abbildung stammt aus Heise *et al.*, 2010.

Die hier identifizierten 302 Tec1-Zielgene können in zwei unterschiedliche Klassen eingeteilt werden (Abb. 2.5B). Klasse I beinhaltet 254 Zielgene von Tec1, die strikt Ste12-abhängig sind, Klasse II beinhaltet 48 Gene, die Ste12-unabhängig durch Tec1 reguliert werden. Tab. 2.1 zeigt die Expression einiger repräsentativer Gene aus Klasse I und Klasse II, die im Rahmen dieser Arbeit ergänzend zu den Transkriptomanalysen mittels quantitativer Realtime-PCR bestimmt wurde.

Tab. 2.1: Expression Tec1-regulierter Gene

Die Expression ausgewählter Tec1-regulierter Gene wurde mittels quantitativer Realtime-PCR bestimmt. Zum Vergleich sind in Klammern die Expressionswerte aus den Microarray-Analysen angegeben.

Gen	<i>tec1Δ</i> vs. <i>TEC1</i> in <i>STE12</i> ¹	<i>tec1Δ</i> vs. <i>URA3(P)-TEC1</i> in <i>ste12Δ</i> ²	<i>TEC1^{TEA}-STE12</i> vs. <i>TEC1 STE12</i> ³
<i>SRD1</i>	-7,8 (-22,2)	-1,1 (-1,3)	-1,3 (-1,1)
<i>PGUI</i>	-2,8 (-6,1)	1,1 (1,1)	-6,9 (-24,3)
<i>AGAI</i>	4,0 (3,8)	1,1 (1,0)	-2,7 (-3,6)
<i>PRM5</i>	-3,3 (-4,9)	1,2 (1,0)	2,9 (2,1)
<i>FLO11</i>	-6,9 (-5,6)	-2,9 (-2,9)	-2,7 (-2,4)
<i>DDR48</i>	-3,2 (-4,7)	-2,5 (-2,0)	2,0 (2,4)
<i>YLR042C</i>	-12,3 (-20,4)	-2,2 (-3,7)	-1,3 (-1,3)
<i>HXK1</i>	-2,1 (-3,1)	-2,1 (-2,4)	-1,1 (-1,1)

¹ Vergleich der Hefestämme YHUM1700 (*tec1Δ STE12*) und YHUM1694 (*TEC1 STE12*).

² Vergleich der Hefestämme YHUM1701 (*tec1Δ ste12Δ*) und YHUM1676 (*URA3(P)-TEC1 ste12Δ*).

³ Vergleich der Hefestämme YHUM1642 (*TEC1^{TEA}-STE12*) und YHUM1694 (*TEC1 STE12*).

Gene, die zu Klasse I gehören, sind *PGUI*, das bei der Biofilmbildung benötigt wird (Madhani *et al.*, 1999), die konjugationsspezifischen Gene *AGAI* und *PRM5* (Heiman & Walter, 2000; Roy *et al.*, 1991) und *SRD1*, das wichtig für die rRNA-Synthese ist (Hess *et al.*, 1994). *FLO11*, *DDR48*, das bei DNA-Schädigungen gebraucht wird (Treger & McEntee, 1990), das mit dem Glucose-Metabolismus assoziierte *HXK1* (Lobo & Maitra, 1977) und *YLR042C*, ein Gen mit noch unbekannter Funktion, gehören zu Klasse II.

Die bioinformatische Analyse mit Hilfe der Datenbank "ChIPCodis" (Abascal *et al.*, 2008) ergibt, dass Gene aus Klasse I für die Bindung durch Tec1, Ste12 und Dig1 angereichert sind. Über 50 % dieser Gene enthalten TCS-Elemente mit der Konsensussequenz RMATTCYY (Daten nicht gezeigt). Mit Hilfe mit der Web-basierten Software "Ceres" (Morris *et al.*, 2010) wurde eine GO-Term-Anreicherung der Klasse-I-Gene für Konjugation ($p < 10^{-10}$) und Ribosomenbiogenese ($p < 10^{-10}$) gefunden.

Gene aus Klasse II sind angereichert für eine Bindung durch die Transkriptionsfaktoren Yap6, Nrg1, Cin5, Skn7, Hsf1 und Msn4 unter hyperoxischem Stress, während unter normalen Wachstumsbedingungen bisher keine Tec1-Bindung nachgewiesen werden konnte (Harbison *et al.*, 2004). Allerdings tragen 59 % der Klasse-II-Gene TCS-Elemente, was die Schlussfolgerung zulässt, dass die Bindung von Tec1 nicht unter Standardbedingungen oder nur unter der Beteiligung weiterer Transkriptionsfaktoren stattfindet. Es wurde eine GO-Term-Anreicherung dieser Gene, zu denen unter anderem *FLO11*, *DDR48*, *YLR042C* und *HXK1* gehören (Tab. 2.1), für Zellwandfunktionen

($p < 10^{-5}$) und Hitzeschockantwort ($p < 10^{-5}$) gefunden. Ergänzend hierzu ergeben die Transkriptomanalysen mit einem Hefestamm, der das Hybridprotein Tec1¹⁻²⁸⁰-Ste12 produziert, dass 78 % der Gene aus Klasse I normal reguliert sind (Abb. 2.5B, Tab. 2.1). Bei der Regulation durch Tec1-Ste12-Komplexe über TCS-Elemente scheint die C-terminale Domäne von Tec1 also nicht unbedingt benötigt zu werden. 72 % der Gene aus Klasse II sind mit Tec1¹⁻²⁸⁰-Ste12 allerdings anders reguliert, was zeigt, dass die normale Regulation dieser Gene vermutlich besonders vom Tec1-C-Terminus abhängt. Die Tec1-regulierten Gene lassen sich also in eine Ste12-abhängige und eine Ste12-unabhängige Klasse einteilen. Es gibt zudem Hinweise auf eine promotorspezifische Regulation der Ste12-unabhängig regulierten Gene, da hier vermutlich weitere Promotorelemente oder Regulatoren involviert sind.

2.1.5 Ste12 kontrolliert die Stabilität von Tec1 über dessen C-terminale Domäne

Bei den Analysen der Tec1-Proteinmengen ist auffällig, dass in Abwesenheit von Ste12 die Tec1-Mengen geringer sind als in Anwesenheit von Ste12. Dies ist auch der Fall, wenn Tec1 vom Ste12-unabhängigen *URA3*-Promotor exprimiert wird (Abb. 2.1A). Da Ste12 die Transkription von *URA3(P)-TEC1* nicht beeinflussen kann, wurde überprüft, ob Ste12 einen Einfluss auf die Stabilität von Tec1 hat. Hierfür wurden die Abbauraten von Tec1 in An- und Abwesenheit Ste12 nach einem Cycloheximid-induzierten Abbruch der zellulären Translation bestimmt. Die Tec1-Proteinmengen wurden in Hefestämmen mit *URA3(P)-TEC1* im *STE12*- und *ste12Δ*-Hintergrund nach Zugabe von Cycloheximid durch quantitatives Immunoblotting ermittelt (Abb. 2.6A, Daten erhoben von B. Heise). Die Abbaurate von Tec1 nimmt in Abwesenheit von Ste12 um mehr als das 5-fache zu. Die Tec1-Ste12-Komplexbildung hat also einen positiven Effekt auf die Tec1-Proteinstabilität. Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Promotor-"Shutoff"-Experiment mit *GALI(P)-TEC1*, welches durch Glucose reprimierbar ist, durchgeführt. Auch hier stellte sich heraus, dass im *ste12Δ*-Hintergrund die Halbwertszeit von Tec1 um ungefähr das 5-fache reduziert ist (Abb. 2.6BC).

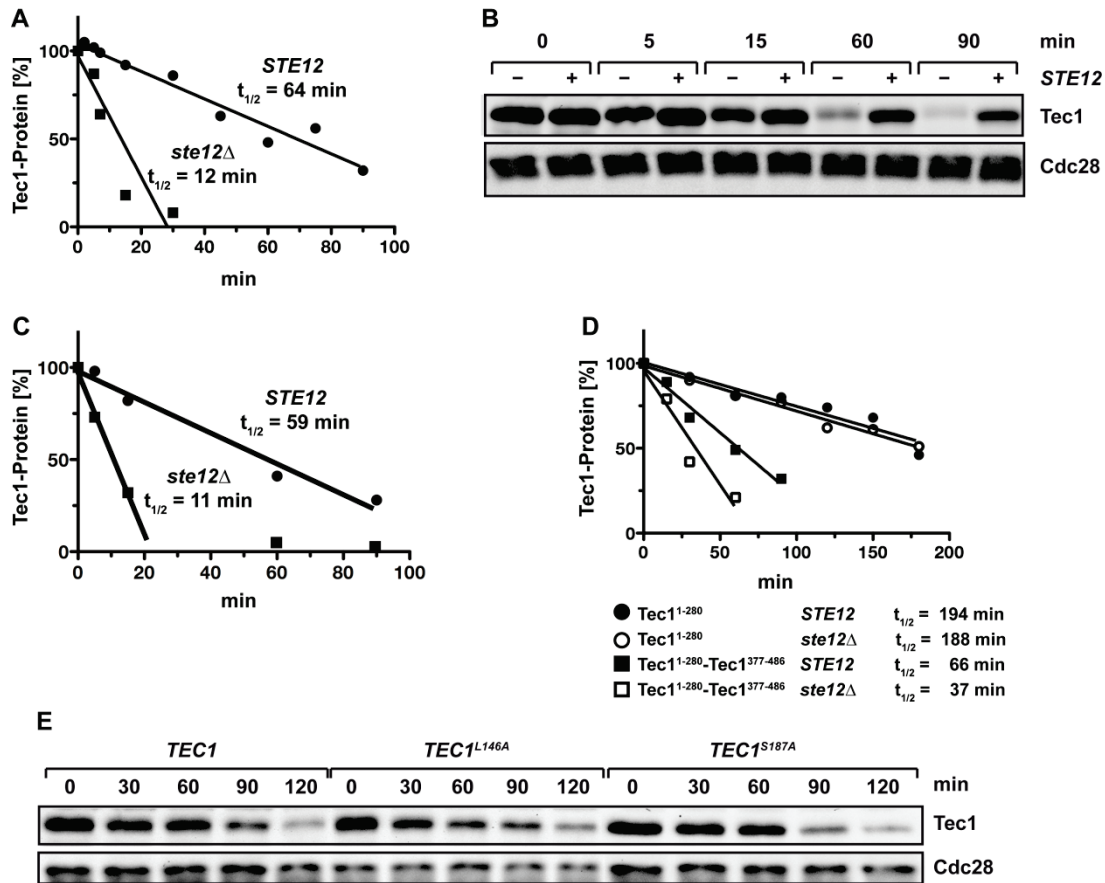


Abb. 2.6: Ste12-Abhängigkeit der Tec1-Proteinstabilität

A) Ste12-abhängige Halbwertszeit von Tec1. Zu exponentiell wachsenden Kulturen von YHUM1727 (*STE12 URA3(P)-TEC1*) und YHUM1718 (*ste12Δ URA3(P)-TEC1*) wurde Cycloheximid gegeben, dann wurden Proben zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen und die Tec1-Menge wurde durch Immunoblotting mit Tubulin als Standard bestimmt und gegen die Zeit (min) aufgetragen. Startmengen wurden auf 100 % gesetzt. **B)** Stabilität von Tec1 in An- und Abwesenheit von *STE12*. Die *TEC1*-Expression in Hefestämmen YHUM1700 (*STE12*) und YHUM1701 (*ste12Δ*), jeweils mit *GAL1(P)-TEC1* (BHUM29), wurde durch 6-stündige Inkubation in Medium mit Galaktose induziert. Um die *TEC1*-Expression zu stoppen, wurden die Zellen in Glucose-haltiges Medium übertragen. Die Tec1-Proteinmengen an den angegebenen Zeitpunkten wurden durch quantitatives Immunoblotting mit Cdc28 als Standard bestimmt. **C)** Ste12-abhängige Halbwertszeit von Tec1. Die relativen Tec1-Mengen im *STE12*- (●) und im *ste12Δ*-Stamm (■) aus B) sind gegen die Zeit (Min) aufgetragen. **D)** Ste12-abhängige Halbwertszeiten von *Tec1*¹⁻²⁸⁰ und *Tec1*¹⁻²⁸⁰-*Tec1*³⁷⁷⁻⁴⁸⁶ in Hefestämmen aus Abb. 2.3 mit Konstrukten 2 und 3. **E)** Abbauraten von Tec1 und Tec1-Varianten, nach Cycloheximid-Zugabe zu exponentiell wachsenden Kulturen von YHUM1363 (*tec1Δ STE12*), der Plasmide mit *TEC1*, *TEC1*^{L146A} oder *TEC1*^{S187A} trägt. Die Abbildung stammt aus Heise *et al.*, 2010.

Schließlich wurde überprüft, ob der C-Terminus von Tec1 wichtig für die Stabilität des Proteins ist, da die Proteinmengen von *Tec1*¹⁻²⁸⁰ deutlich erhöht waren (Abb. 2.3A). Tatsächlich ist die Halbwertszeit von *Tec1*¹⁻²⁸⁰ im Vergleich zu Tec1 um das 3-fache erhöht (Abb. 2.6D). Überraschenderweise ist die Stabilität von *Tec1*¹⁻²⁸⁰ auch nicht mehr Ste12-abhängig. Fusioniert man *Tec1*³⁷⁷⁻⁴⁸⁶ jedoch wieder an *Tec1*¹⁻²⁸⁰, sinkt die Halbwertszeit des Konstrukts um das 3-fache und gleicht der von Tec1. Gleichzeitig wird die Stabilitätskontrolle durch Ste12 wiederhergestellt (Abb. 2.6D). Ste12 kontrolliert also die Tec1-Stabilität über dessen C-Terminus. Punktmutationen von

Aminosäuren der Tec1-TEA-DNA-Bindedomäne, die für eine effiziente TCS-abhängige Genexpression und die für die Kernlokalisierung von Tec1 wichtig sind, haben jedoch keine Auswirkungen auf die Stabilität von Tec1 (Abb. 2.6E).

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass Tec1 auch Ste12-unabhängig Zielgenaktivierung über TCS-Elemente vermitteln kann. Die Tec1-Zielgene können in zwei Klassen eingeteilt werden, von denen eine Ste12-abhängig und eine Ste12-unabhängig reguliert wird. Ste12 kann die Stabilität von Tec1 über dessen C-terminale Domäne regulieren, die außerdem eine Ste12-unabhängige Transkriptionsaktivierungsdomäne enthält.

2.2 Tec1 interagiert mit den Co-Aktivatoren Msa1 und Msa2 zur Kontrolle von Zellgröße und Differenzierung

2.2.1 Tec1 interagiert mit Msa1 und Msa2

Auf der Suche nach neuen Tec1-Interaktionspartnern wurde in einer vorhergehenden Arbeit (Brückner, 2002) in einem genomweiten "Yeast-Two-Hybrid-Screen" der G1-spezifische Regulator Msa2 als möglicher Interaktionspartner für Tec1 identifiziert. In der vorliegenden Dissertation wurde zunächst die potentielle *in-vivo*-Interaktion von Tec1 mit Msa2 und seinem Ortholog Msa1 näher untersucht. Aus diesem Grund wurden Co-Affinitätsreinigungen mit GST-markierten Msa1- und Msa2-Proteinen durchgeführt. Die *GALI(P)*-getriebenen Fusionsgene *GST-MSA1* und *GST-MSA2* wurden auf einem "low-copy"-Plasmid in den *S. cerevisiae*-Stamm YHUM216 eingebracht, der auch *TEC1*, *MSA1* und *MSA2* im Genom trägt. Zusätzlich wurde *TEC1(P)-Myc3-TEC1* von einem "high-copy"-Plasmid exprimiert. Als Kontrolle diente *GST*. GST, GST-markiertes Msa1 oder Msa2 und assoziierte Proteine wurden über Glutathion-Agarose gereinigt. Die Anwesenheit von Tec1 in der Ladekontrolle (L) und in GST-gereinigten Proteinkomplexen (P) wurde im Immunoblot mit Antikörpern gegen Myc nachgewiesen. GST, GST-markiertes Msa1 oder Msa2 wurden mit GST-spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Es konnte eine eindeutige Interaktion von Tec1 sowohl mit Msa1 als auch mit Msa2 nachgewiesen werden (Abb. 2.7A).

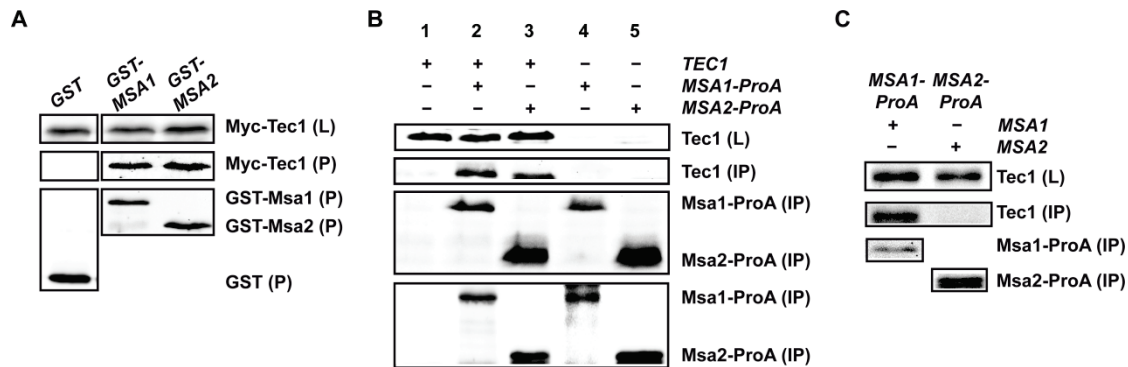


Abb. 2.7: Interaktionen zwischen Tec1, Msa1 und Msa2

A) Co-Affinitätsreinigung von Tec1-Myc mit GST-Msa1 und GST-Msa2, durchgeführt mit Hefestamm YHUM216, der Plasmide pYGEX-2T (*GST*), BHUM1696 (*GST-MSA1*), BHUM1697 (*GST-MSA2*) jeweils zusammen mit *Myc-TEC1* (BHUM768) trägt. Tec1-Myc in der Ladekontrolle (L) und in GST-gereinigten Proteinkomplexen (P) wurde mit Myc-Antikörpern nachgewiesen. GST, GST-markiertes Msa1 und Msa2 wurden mit GST-Antikörpern detektiert. **B)** Co-Immunopräzipitation von Tec1 mit Msa1-ProA und Msa2-ProA, durchgeführt mit Hefestämmen YHUM1694 (nicht markiert) (1), YHUM1995 (*MSA1-ProA*) (2), YHUM1996 (*MSA2-ProA*) (3), YHUM1997 (*MSA1-ProA tec1Δ*) (4) und YHUM1998 (*MSA2-ProA tec1Δ*) (5). Tec1 in der Ladekontrolle (L) und immunpräzipitierten Proteinkomplexen (IP) wurde mit Tec1-Antikörpern detektiert, Msa1-ProA und Msa2-ProA mit Sekundärantikörpern. **C)** Co-Immunopräzipitation von Tec1 mit Msa1-ProA und Msa2-ProA mit Hefestämmen YHUM2000 (*MSA1-ProA msa2Δ*) und YHUM1999 (*MSA2-ProA msa1Δ*). Für Details siehe B.

Anschließend wurde mit Hilfe einer Co-Immunopräzipitation überprüft, ob sich dieses Ergebnis mit nativen Tec1-, Msa1- und Msa2-Mengen verifizieren lässt. Hierfür wurden Hefestämmen verwendet, die Tec1 und ProA-markiertes Msa1 oder Msa2 von einzelnen genomischen Kopien aus produzieren. Msa1-ProA, Msa2-ProA und assoziierte Proteine wurden über IgG-Sepharose gereinigt. Die Anwesenheit von Tec1 in der Ladekontrolle (L) und in immunpräzipitierten Proteinkomplexen (IP) wurde im Immunoblot mit Antikörpern gegen Tec1 nachgewiesen. Msa1-ProA und Msa2-ProA wurden mit Sekundärantikörpern (Donkey anti-Goat) nachgewiesen, da die ProteinA-Markierung mit dem IgG-Teil der Sekundärantikörper interagieren kann. Auch die Co-Immunopräzipitation zeigt die Interaktion von Tec1 mit Msa1 und Msa2 (Abb. 2.7B). Die Interaktion von Tec1 mit Msa1 ist etwas stärker als die von Tec1 mit Msa2, da mit Msa1 etwas mehr Tec1 präzipitiert werden kann. Die Tec1-Msa1-Interaktion kann in einem *msa2Δ*-Stamm nicht unterbrochen werden (Abb. 2.7C). Das Fehlen von *MSA1* jedoch führt zum Verlust der Tec1-Msa2-Interaktion.

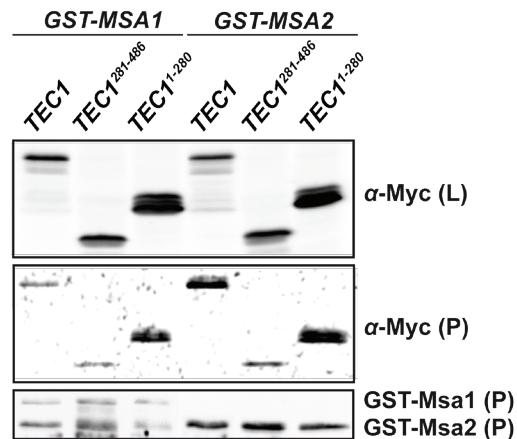


Abb. 2.8: Interaktion von Tec1, Tec1²⁸¹⁻⁴⁸⁶ und Tec1¹⁻²⁸⁰ mit Msa1 und Msa2

Plasmide mit *GST-MSA1* (BHUM1696) oder *GST-MSA2* (BHUM1697) wurden jeweils zusammen mit Plasmiden, die *Myc3-TEC1* (BHUM768), *Myc3-TEC1²⁸¹⁻⁴⁸⁶* (BHUM769) oder *Myc3-TEC1¹⁻²⁸⁰* (BHUM760) tragen, in den Hefestamm YHUM1048 (*tec1Δ*) transformiert. GST-markierte Proteine wurden über Gluthation-Agarose gereinigt. Die Anwesenheit von Tec1-Myc, Myc-Tec1²⁸¹⁻⁴⁸⁶ und Myc-Tec1¹⁻²⁸⁰ in der Ladekontrolle (L) und in GST-gereinigten Proteinkomplexen (P) wurde im Immunoblot mit Antikörpern gegen Myc (α -Myc) nachgewiesen. GST-markiertes Msa1 oder Msa2 wurde mit GST-spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

Des Weiteren war es interessant herauszufinden, ob es eine Tec1-Domänenspezifität bezüglich der Msa1- und Msa2-Interaktion gibt. Der Tec1-N-Terminus vermittelt DNA-Bindung, der C-Terminus ist für Transkriptionsaktivierung, Ste12-Interaktion und Destabilisierung zuständig ist (Bürglin 1991; Köhler *et al.*, 2002; Chou *et al.*, 2006; diese Arbeit). Daher wurden Co-Affinitätsreinigungen mit GST-markiertem Msa1 und Msa2 in einem *tec1Δ*-Stamm durchgeführt, der zusätzlich Myc-markiertes *TEC1*, *TEC1²⁸¹⁻⁴⁸⁶* oder *TEC1¹⁻²⁸⁰* auf "high-copy"-Plasmiden trägt (Abb. 2.8). Sowohl Tec1²⁸¹⁻⁴⁸⁶, als auch Tec1¹⁻²⁸⁰, können beide mit Msa1 und Msa2 interagieren. Es gibt somit keine eindeutige Tec1-Domänenspezifität bezüglich der Msa1- und Msa2-Interaktion.

1.1.1 Msa1 und Msa2 beeinflussen die Tec1-vermittelte Genexpression

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob Msa1 und Msa2 Tec1-abhängige Funktionen beeinflussen können. Hierfür wurde die Aktivierung eines TCS-getriebenen *lacZ*-Reportergens mittels eines β -Galaktosidasetests in *msa1Δ*-, *msa2Δ*- und *msa1Δ msa2Δ*-Deletionsstämmen bestimmt. Es wurden neben Hefestämmen mit *TEC1(P)-TEC1* auch solche Stämme untersucht, die *URA3(P)-TEC1* in An- oder Abwesenheit von *STE12* exprimieren. Dies diente dazu, die Tec1-Msa1- und die Tec1-Msa2-Interaktion bei der TCS-vermittelten Transkriptionsaktivierung unabhängig von Ste12 und der Zellzykluskontrolle von *TEC1* zu charakterisieren.

Die Tec1-Proteinmengen in den Deletionsstämmen wurden zunächst mittels Immunoblotting mit Tec1-spezifischen Antikörpern bestimmt (Abb. 2.9A). Es sind keine signifikanten Änderungen der Tec1-Mengen in *msa1Δ*-, *msa2Δ*- oder *msa1Δ msa2Δ*-Stämmen festzustellen. Die TCS-*lacZ*-Reporterexpression (Abb. 2.9B) wurde für die in Abb. 2.9A bestimmten Tec1-Mengen korrigiert.

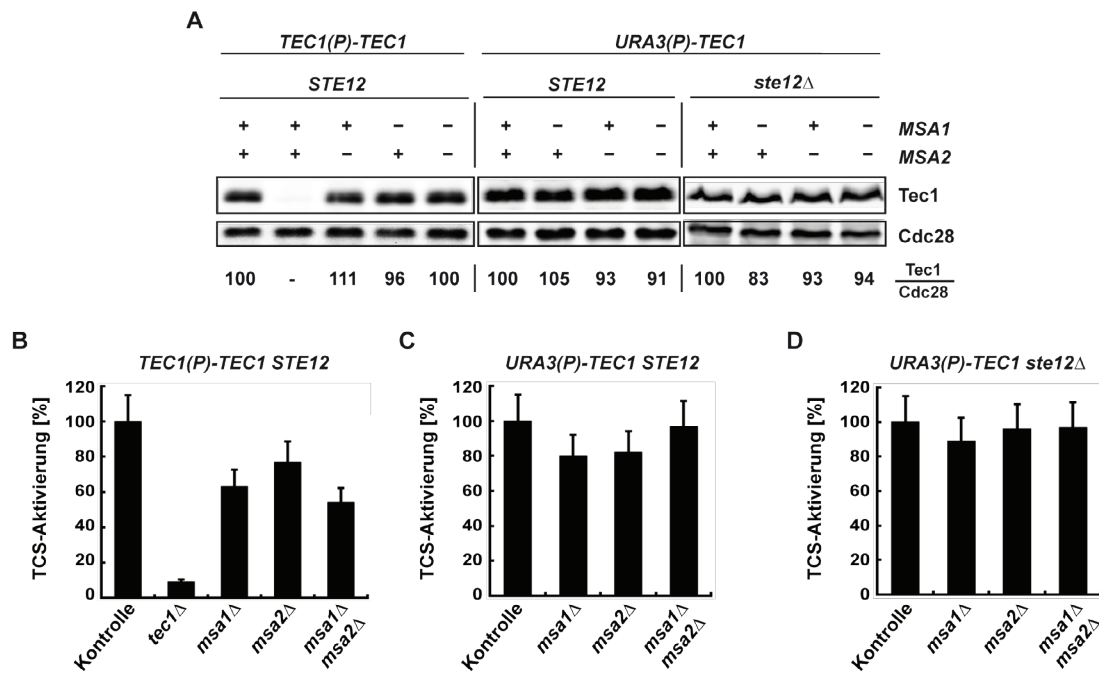


Abb. 2.9: Aktivierung eines TCS-*lacZ*-Reportergens durch Tec1 in An- und Abwesenheit von Msa1 und Msa2

A) Tec1-Proteinmengen in *msa1Δ*-, *msa2Δ*- und *msa1Δ msa2Δ*-Stämmen. Die Tec1-Mengen wurden mittels Immunoblotting mit Tec1-spezifischen Antikörpern bestimmt, Cdc28 diente als interner Standard. Die Tec1-Menge ist jeweils als Prozentsatz der Tec1-Menge des entsprechenden *MSA1 MSA2*-Kontrollstamms angegeben. **B)** TCS-*lacZ*-Reporterexpression in Hefestämmen mit *TEC1(P)-TEC1* und *STE12*, bestimmt durch β -Galaktosidase-messungen in YHUM1694 (Kontrolle), YHUM1864 (*msa1Δ*), YHUM1865 (*msa2Δ*) und YHUM1900 (*msa1Δ msa2Δ*). Die Balken zeigen die TCS-Aktivierung relativ zur Kontrolle, die Werte wurden für die in A bestimmten Tec1-Mengen korrigiert. Die Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Messungen war nicht höher als 15 %. **C)** Relative TCS-*lacZ*-Aktivierung in Hefestämmen mit *URA3(P)-TEC1* und *STE12*, bestimmt in YHUM1631 (Kontrolle), YHUM1880 (*msa1Δ*), YHUM1881 (*msa2Δ*) und YHUM1899 (*msa1Δ msa2Δ*). Für Details siehe B. **D)** Relative TCS-*lacZ*-Aktivierung in Hefestämmen mit *URA3(P)-TEC1* und *ste12Δ*, bestimmt in YHUM1637 (Kontrolle), YHUM1874 (*msa1Δ*), YHUM1875 (*msa2Δ*) und YHUM1983 (*msa1Δ msa2Δ*) verwendet. Für Details siehe B.

Im *tec1Δ*-Stamm ist die relative TCS-Aktivierung erwartungsgemäß sehr gering. Die Abwesenheit von *MSA1*, *MSA2* oder beiden Genen führt in Stämmen mit *TEC1(P)-TEC1* zu einer signifikanten Abnahme der TCS-Expression. Bei *msa1Δ* fällt sie auf etwa 60 % des Ursprungswertes ab. Bei *msa2Δ* liegt die Transkriptionsaktivierung im Vergleich zur Kontrolle noch bei 77 %, während sie in der Doppelmutante sogar auf 54 % absinkt.

Wird *TEC1* vom *URA3*-Promotor aus getrieben, ist die Reduktion der TCS-Reportergenaktivierung in den Deletionsstämmen etwas geringer (Abb. 2.9CD). In Abwesenheit von *MSA1* und *MSA2* fällt sie auf etwa 80 % des Wertes der Kontrolle. In der Doppelmutante ist nahezu keine Abnahme der Transkriptionsaktivierung zu beobachten (Abb. 2.9C). Fehlt zusätzlich *STE12* (Abb. 2.9D), sind die Unterschiede zwischen den einzelnen Hefestämmen noch geringer und die TCS-Aktivierung geht um höchstens 11 % (*msa1Δ*) zurück.

Es wurde die Möglichkeit überprüft, dass das Fehlen von Msa1 oder Msa2 die Stabilität des Tec1-Proteins verändert und somit die Reduktion der TCS-Expression verursacht. Hierfür wurde der Abbau von Tec1 in *msa1Δ*-, *msa2Δ*- und *msa1Δ msa2Δ*-Stämmen nach einem Cycloheximid-induzierten Abbruch der zellulären Translation verfolgt (Abb. 2.10).

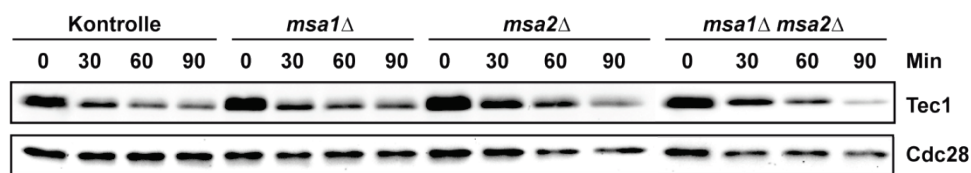


Abb. 2.10: Abbau von Tec1 in An- und Abwesenheit von Msa1 und Msa2

Der Abbau von Tec1 in den Hefestämmen YHUM1688 (Kontrolle), YHUM1882 (*msa1Δ*), YHUM1882 (*msa2Δ*) und YHUM1902 (*msa1Δ msa2Δ*) wurde nach Zugabe von Cycloheximid zu exponentiell wachsenden Kulturen durch Messung der Tec1-Mengen zu den angegebenen Zeitpunkten mittels Immunoblotting mit Tec1-spezifischen Antikörpern bestimmt. Als Vergleich dient die Cdc28-Menge.

Das Fehlen von *MSA1* oder *MSA2* hat jedoch keine erkennbare Auswirkung auf den Abbau von Tec1. Diese Daten lassen darauf schließen, dass Msa1 und Msa2 die Tec1-abhängige Genexpression direkt am Promotor beeinflussen. Allerdings ist dieser Effekt deutlich stärker, wenn *TEC1* von seinem natürlichen Promotor aus exprimiert wird und Ste12 in der Zelle vorhanden ist.

Als Nächstes wurde der Effekt von Msa1 und Msa2 auf die Expression des biofilmspezifischen Tec1-Zielgens *FLO11* untersucht. Hierfür wurde die Aktivierung eines *FLO11(P)*-getriebenen *CFP*-Reportergens (siehe auch Kapitel 2.3) in *msa1Δ*-, *msa2Δ*- und *msa1Δ msa2Δ*-Stämmen mittels quantitativer Fluoreszenzmikroskopie untersucht (Abb. 2.11A). In einem *tec1Δ*-Stamm sind im Vergleich zur Kontrolle nur noch 13 % der *FLO11*-*CFP*-Expression zu detektieren. Das Fehlen von Msa1 oder Msa2 führt zu einer Abnahme der *FLO11*-*CFP*-Expression um 44 bzw. 23 %. Die Abwesenheit beider Proteine in der Doppelmutante jedoch verursacht eine fast 3-fache Reduktion der *FLO11*-Expression. Die Flo11-vermittelte Biofilmbildung, die mit Hilfe

von quantitativen Plastikadhäsionstests bestimmt wurde, ist in der *msa1Δ msa2Δ*-Doppelmutante ähnlich stark reduziert, um mehr als das Zweifache im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 2.11B). Das Fehlen von *MSA1* und *MSA2* kann jedoch durch *TEC1*, das auf einem "high-copy"-Plasmid (*hc-TEC1*) in die Deletionsstämme eingebracht wurde, komplementiert werden.

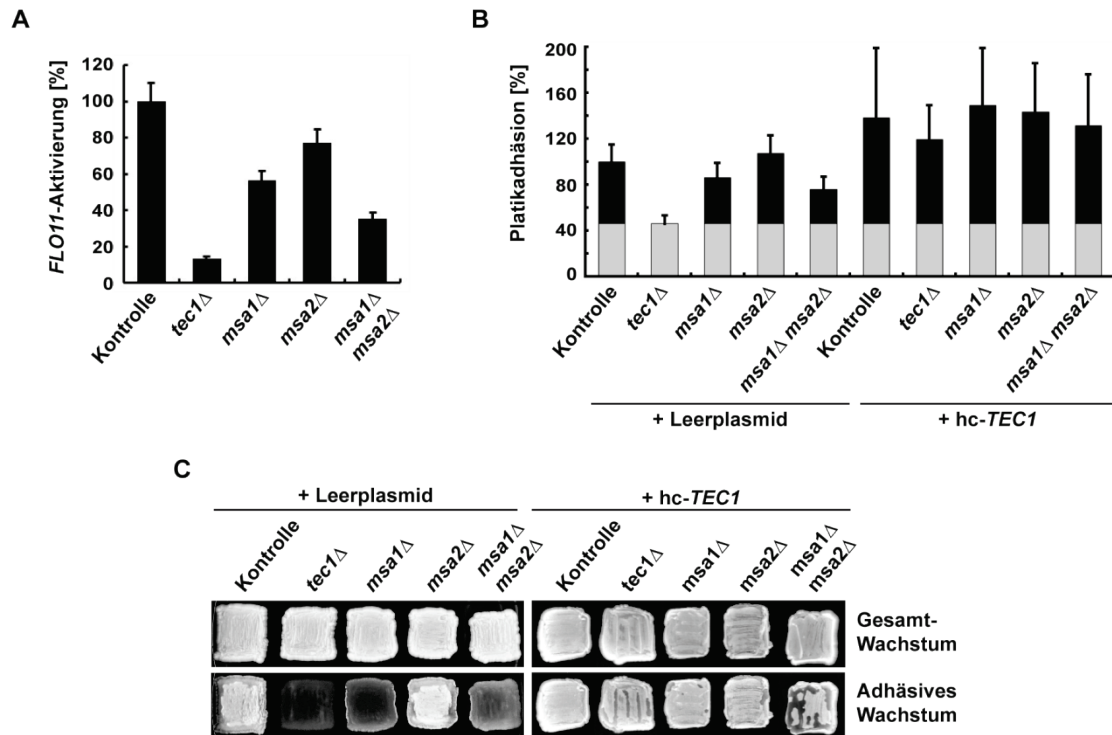


Abb. 2.11: Expression von *FLO11* und Biofilmbildung in An- und Abwesenheit von *Msa1* und *Msa2*

A) Aktivierung eines *FLO11*-CFP-Reportergens in den Hefestämmen YHUM1988 (Kontrolle), YHUM2194 (*tec1Δ*), YHUM2050 (*msa1Δ*), YHUM2051 (*msa1Δ*) und YHUM2052 (*msa1Δ msa2Δ*), bestimmt durch quantitative Fluoreszenzmikroskopie. Die Balken zeigen die relative *FLO11*-CFP-Aktivierung, die im Kontrollstamm auf 100 % gesetzt wurde. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. **B)** Adhäsion an Plastik der Hefestämme YHUM1694 (Kontrolle), YHUM1700 (*tec1Δ*), YHUM1864 (*msa1Δ*), YHUM1865 (*msa2Δ*) und YHUM1900 (*msa1Δ msa2Δ*) jeweils mit Leerplasmid (YEplac195) und mit *TEC1*-Überexpression (BHUM30). Die Balken zeigen die relative Adhäsion an Polystyrol, die im Kontrollstamm auf 100 % gesetzt wurde. Die relative Adhäsion des *tec1Δ*-Stamms ist grau markiert und dient als Basislinie, Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. **C)** Adhäsives Wachstum der in B genannten Hefestämme, bestimmt nach Wachstum auf SC-Ura-Agar. Die Platten wurden vor (Gesamtwachstum) und nach (adhäsives Wachstum) Entfernung der nicht-adhäsiven Zellen durch einen Waschtest fotografiert.

Wie ebenfalls in Abb. 2.11B zu sehen ist, steigt die Biofilmbildung auf Plastik bei *TEC1*-Überexpression auf mindestens 120 % des Ursprungswertes an. Ähnliche Ergebnisse konnten mit einem Adhäsionstest auf Agar erzielt werden. Unter diesen Bedingungen zeigt sich eine deutliche Reduktion der Adhäsion beim *msa1Δ*- und dem *msa1Δ msa2Δ*-Stamm. Die Deletion von *MSA2* hat keinen Effekt (Abb. 2.11C). Auch hier kann die Reduktion der Biofilmbildung durch Überexpression von *TEC1* aufgehoben werden.

Insgesamt lassen die hier erzielten Resultate darauf schließen, dass Msa1 und Msa2 einen Einfluss auf die Tec1-abhängige Genexpression haben und dass Msa1 die Biofilmbildung beeinflusst.

2.2.3 Tec1 ist ein positiver Regulator der Zellgröße, während Msa1 und Msa2 die Zellgröße negativ regulieren

Um die Interaktion von Tec1 mit Msa1 und Msa2 weiter zu charakterisieren, wurde untersucht, ob Tec1 bekannte Funktionen von Msa1 und Msa2 beeinflussen kann. In Ashe *et al.*, 2008 wurde gezeigt, dass Msa1 ein wichtiger Regulator der Zellgröße ist und es wurde vermutet, dass Msa2 wahrscheinlich eine ähnliche Aufgabe ausführt. Msa1 und Msa2 werden für die Transkription von G1-spezifischen Genen und die Initiation des Zellzyklus benötigt. Fehlen sie, verbleiben die *S. cerevisiae*-Zellen länger in der G1-Phase, wodurch eine stärkere Zunahme des Zellvolumens im Vergleich zu nicht-mutierten Zellen erfolgt (Ashe *et al.*, 2008). In den nachfolgend beschriebenen Versuchen wurde die Zellgröße von *tec1Δ*-Stämmen ermittelt und mit den Zellgrößen von *msa1Δ*-, *msa2Δ*- und *msa1Δ msa2Δ*-Stämmen verglichen (Abb. 2.12).

Die Zellvolumina wurden mit einem Partikelanalysegerät (BECKMAN-COULTER) bestimmt, das Widerstandsänderungen beim Durchgang von Partikeln durch eine Kapillare misst. Ergänzend hierzu wurde das Zellvolumen einiger Stämme mit Hilfe von Mikroskopie-Bildern ermittelt. Die Zellen stammten jeweils aus exponentiell wachsenden Kulturen.

Wie in Abb. 2.12A ersichtlich ist, führt das Fehlen von *TEC1* zu einer signifikanten Reduktion der Zellgröße. Die Zellen des *tec1Δ*-Stammes besitzen nur 85 % des Volumens des Kontrollstammes. Dieses Resultat konnte durch Messung der Zellgröße eines anderen *tec1Δ*-Stammes im Vergleich mit seinem Ausgangsstamm bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Auch die Bestimmung der relativen Zellgröße durch Mikroskopie (Abb. 2.12B) ergibt eine deutliche Reduktion der Zellgröße um 20 % im *tec1Δ*-Stamm. Im Gegensatz dazu führt die Deletion von *MSA2* zu einem vergrößerten Zellvolumen von 126 % (Abb. 2.12A). Das Fehlen von *MSA1* hat eine geringere positive Auswirkung auf die Zellgröße (105 %). Die Zellen der *msa1Δ msa2Δ*-Doppelmutante sind jedoch um 33 % größer als die der Kontrolle. Dies deutet auf einen additiven Effekt von *MSA1* und *MSA2* hin. Auch die Bestimmung der Zellvolumina mit dem Mikroskop ergab ähnliche Werte für die *MSA*-Mutanten (Abb. 2.12B).

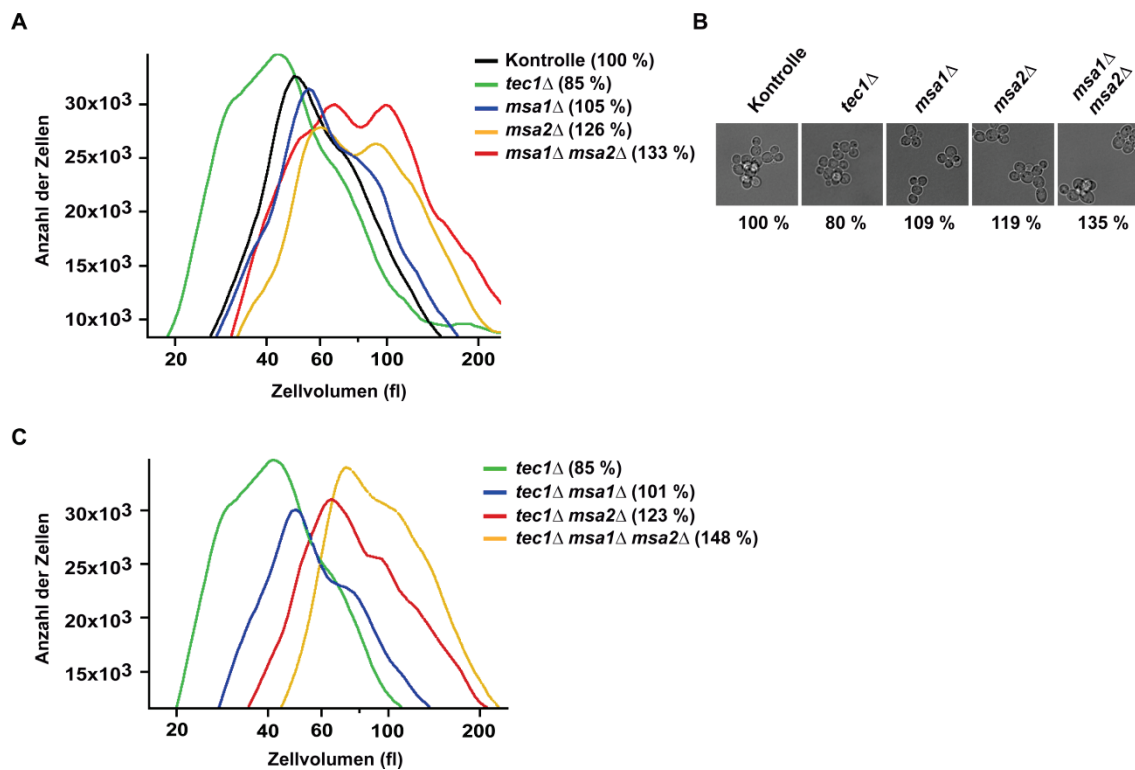


Abb. 2.12: Regulation der Zellgröße durch Tec1, Msa1 und Msa2

A) Vergleich der Zellgrößen der Hefestämme YHUM1694 (Kontrolle), YHUM1700 (*tec1*Δ), YHUM1864 (*msa1*Δ), YHUM1865 (*msa2*Δ) und YHUM1900 (*msa1*Δ *msa2*Δ). Die Zellvolumina wurden mit dem Partikelanalysegerät "Multisizer™ 3" ermittelt. Die Kurven zeigen jeweils eine repräsentative Messung der Zellvolumina aufgetragen gegen die Anzahl der Zellen. Die Prozentwerte in Klammern wurden berechnet aus den Medianwerten der Zellvolumina mindestens dreier Messungen mit jeweils rund 30.000 Zellen, die ins Verhältnis zur Kontrolle (100 %) gesetzt wurden. **B)** Vergleich der Zellgrößen der in A genannten Hefestämme. Das Zellvolumen wurde anhand von Durchlicht-Mikroskopiebildern ermittelt. Länge und Breite von jeweils 200 Zellen wurden mit dem Programm "ImageJ" bestimmt, das Zellvolumen mit der Formel für ein gestrecktes Rotationsellipsoid ($V = 4/3 \times \pi abc$) berechnet und als Prozentwert des Kontrollstamms angegeben. **C)** Zellgrößen der Hefestämme YHUM1700 (*tec1*Δ), YHUM1868 (*tec1*Δ *msa1*Δ), YHUM1869 (*tec1*Δ *msa2*Δ) und YHUM1901 (*tec1*Δ *msa1*Δ *msa2*Δ), bestimmt mit "Multisizer™ 3". Für Details siehe A.

Als Nächstes wurde der Einfluss verschiedener Kombinationen von *TEC1*-, *MSA1*- und *MSA2*-Deletionen auf die Zellgröße untersucht, um mögliche genetische Interaktionen zu identifizieren (Abb. 2.12C). Es stellte sich heraus, dass die *MSA1*- und *MSA2*-Einzeldelationen teilweise den Effekt von *tec1*Δ supprimieren können, da die Zellgrößen von *tec1*Δ *msa1*Δ- und *tec1*Δ *msa2*Δ-Stämmen ähnlich denen der *msa1*Δ- und *msa2*Δ-Stämme sind. Auch die Dreifachmutante (*tec1*Δ *msa1*Δ *msa2*Δ) hat ein deutlich vergrößertes Zellvolumen, ähnlich wie die *msa1*Δ *msa2*Δ-Doppelmutante (Abb. 2.12AC). Diese Daten deuten darauf hin, dass *MSA1* und *MSA2* epistatisch über *TEC1* bei der Regulation der Zellgröße sind.

Die Rolle von Tec1 bei der Regulation der Zellgröße war bisher noch nicht bekannt und wurde daher weiter charakterisiert. Eine *TEC1*-Überexpression auf Plasmid führt

ebenso wie die Abwesenheit der *MSA*-Gene zu größeren, etwas verlängerten Zellen (Abb. 2.13).

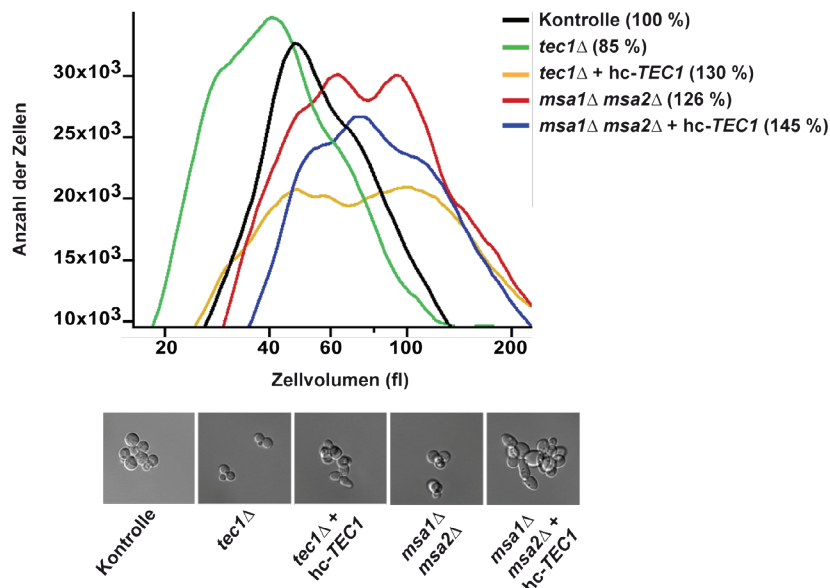


Abb. 2.13: Einfluss einer *TEC1*-Überexpression auf die Zellgröße

Vergleich der Zellgrößen der Hefestämme YHUM1700 (*tec1Δ*) und YHUM1900 (*msa1Δ msa2Δ*) jeweils mit und ohne *TEC1*-Überexpression durch Plasmid BHUM30. Die Zellenvolumina wurden mit dem Partikelanalysegerät "Multisizer™ 3" bestimmt. Für Details siehe Abb. 2.12.

Das Zellvolumen kann weiter vergrößert werden, wenn *TEC1* in einer *msa1Δ msa2Δ*-Doppelmutante überexprimiert wird. Auch hier sind die Zellen verlängert, ein Phänomen, das vermutlich mit der Tec1-abhängigen starken Induktion des adhäsiven Wachstums einhergeht. Zudem wurde die Auswirkung von regulierbarem *GALI(P)-TEC1* in einem *tec1Δ*-Stamm auf die Zellgröße untersucht (Tab. 2.2).

Tab. 2.2: Einfluss von regulierbarem *GALI(P)-TEC1* auf die Zellgröße

Die Zellgrößen des Hefestamms YHUM1048 (*tec1Δ*), der entweder ein Leerplasmid (B2445) oder ein Plasmid mit *GALI(P)-TEC1* (BHUM29) trägt, wurden jeweils unter induzierenden Bedingungen (SC – Uracil + Galaktose) und reprimierenden Bedingungen (SC – Uracil + Glucose) mit dem Partikelanalysegerät "Multisizer™ 3" bestimmt. Um nährstoffbedingte Zellgrößenunterschiede von der Berechnung auszuschließen, wurden jeweils die Größen-Medianwerte der Zellen mit Leerplasmid auf 100 % gesetzt.

Stamm	Galaktose	Glucose
<i>tec1Δ</i> + Leerplasmid	100 %	100 %
<i>tec1Δ</i> + <i>GALI(P)-TEC1</i>	114 %	81 %

Die Induktion von *GALI(P)-TEC1* in durch Galaktose führt zu größeren Zellen, während die Repression von *GALI(P)-TEC1* durch Glucose zu kleineren Zellen führt.

Des Weiteren wurde untersucht, ob der Effekt von Tec1 auf die Zellgröße auch von Ste12 abhängig ist (Abb. 2.14).

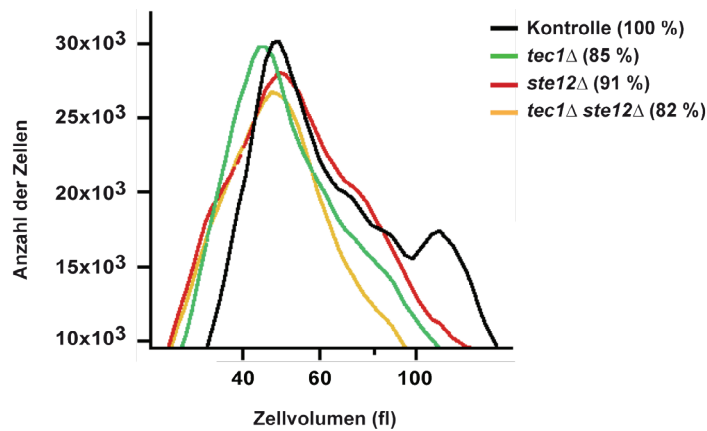


Abb. 2.14: Regulation der Zellgröße durch Ste12

Vergleich der Zellgrößen der Hefestämme YHUM1694 (Kontrolle), YHUM1700 (*tec1Δ*), YHUM1692 (*ste12Δ*) und YHUM1701 (*tec1Δ ste12Δ*). Die Zellvolumina wurden mit dem Partikelanalysegerät "Multisizer™ 3" bestimmt. Für Details siehe Abb. 2.12.

Die Deletion von *STE12* führt zu einer Abnahme der Tec1-Menge, da die *TEC1*-Transkription und die Tec1-Stabilität von Ste12 positiv reguliert werden (Heise *et al.*, 2010; Köhler *et al.*, 2002). Erwartungsgemäß sind die *ste12Δ*-Zellen kleiner als die Zellen eines Kontrollstammes. *TEC1* und *STE12* scheinen jedoch keinen additiven Effekt auf die Zellgröße zu haben, da die *tec1Δ ste12Δ*-Doppelmutante ähnlich kleine Zellen wie die *tec1Δ*-Einzelmutante besitzt (Abb. 2.14).

In diesem Abschnitt konnte also gezeigt werden, dass Tec1 ein Dosis-abhängiger Regulator der Zellgröße ist. Dieser bisher unbekannten Funktion von Tec1 wirken Msa1 und Msa2 entgegen.

2.2.4 Tec1, Msa1 und Msa2 können Gene für Aminosäurebiosynthese, Konjugation und Ribosomenproduktion gemeinsam regulieren

Eine genomweite Transkriptanalyse sollte Aufschluss darüber geben, welche Gene von Tec1, Msa1 und Msa2 reguliert werden und ob es gemeinsam regulierte Gene gibt. Für die Analyse wurden Transkriptprofile von *tec1Δ*-, *msa1Δ*-, *msa2Δ*- und *msa1Δ msa2Δ*-Stämmen unter Verwendung von GeneChip® Yeast Genome 2.0 Arrays (Affymetrix) erstellt. Aus exponentiell wachsenden *S. cerevisiae*-Kulturen wurde die RNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben, mit Biotin markiert und die Proben wurden mit den Arrays hybridisiert. Nach Detektion der Signale wurden die Daten mittels einer Affymetrix-Software normalisiert, die Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel. Es wurden solche

Gene als differentiell exprimiert eingeordnet, bei denen der Unterschied der Expression im Vergleich zum Kontrollstamm ≥ 15 war und deren Expression mindestens um den Faktor 1,5 im Vergleich zum Kontrollstamm verändert war. Die Daten sind auf der ArrayExpress-Datenbank (www.ebi.ac.uk) unter der Zugangsnummer E-MEXP-3619 einsehbar. Anzahlen und Schnittmengen differentiell exprimierter Gene sind in Abb. 2.15 dargestellt.

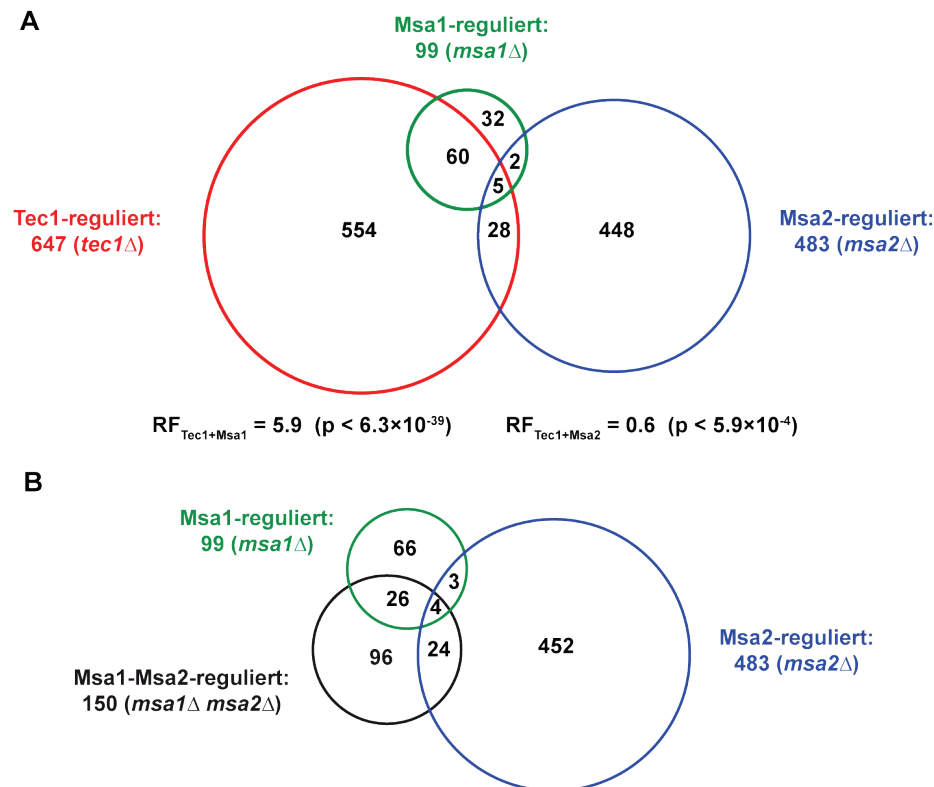


Abb. 2.15: Genomweite Transkriptanalysen von *tec1Δ*-, *msa1Δ*- und *msa2Δ*-Stämmen

A) Venn-Diagramm mit den Anzahlen der Gene in den Hefestämmen YHUM1700 (*tec1Δ*) (rot), YHUM1864 (*msa1Δ*) (grün) und YHUM1865 (*msa2Δ*) (blau), bei denen der Unterschied der Expression im Vergleich zum Kontrollstamm (YHUM1694) ≥ 15 ist und deren Expression mindestens um den Faktor 1,5 im Vergleich zum Kontrollstamm verändert ist. Die Genexpression wurde aus dem Durchschnittswert der Signalintensitäten von Duplikaten bestimmt. Anzahlen überlappender Gene einzelner Gruppen sind ebenfalls angegeben. Repräsentationsfaktoren (RFs, Berechnung siehe Text) sind Indikatoren für genspezifische Interaktionen zwischen Tec1, Msa1 oder Msa2. **B)** Venn-Diagramm mit den Anzahlen der regulierten Gene in den Hefestämmen YHUM1864 (*msa1Δ*) (grün), YHUM1865 (*msa2Δ*) (blau) und YHUM1900 (*msa1Δ msa2Δ*) (schwarz).

Die genomweite Transkriptanalyse ergibt, dass 647 Gene mindestens 1,5-fach durch Tec1 reguliert werden. 99 Gene sind durch Msa1 reguliert und Msa2 reguliert 483 Gene (Abb. 2.15A). Die Identifikation gemeinsam regulierter Gene erfolgte mit der Internetanwendung BioVenn (<http://www.cmbi.ru.nl/cdd/biovenn>). Es wurden 65 Gene gefunden, die durch Tec1 und Msa1 co-reguliert sind. Für diese Überlappung wurde ein Repräsentationsfaktor (RF) von 5,9 ($p < 6,3 \times 10^{-39}$) berechnet. Der RF setzt die Anzahl

der überlappenden Gene ins Verhältnis zur Gesamtzahl der regulierten Gene und zur Gesamtzahl der *S. cerevisiae*-Gene. Der vergleichsweise hohe RF der im *tec1Δ*- und *msa1Δ*-Stamm co-regulierten Gene deutet auf eine signifikante funktionelle Interaktion zwischen Tec1 und Msa1 hin. Bei Tec1 und Msa2 wurden 33 co-regulierte Gene gefunden. Diese Überlappung ergibt aber bei Berücksichtigung der Gesamtzahlen der regulierten Gene in beiden Deletionsstämmen einen RF von nur 0,6 ($p < 5,9 \times 10^{-4}$) (Abb. 2.15A). Bei Tec1 und Msa2 gibt es also deutlich weniger Interaktionen bei der Transkriptionsregulation.

Tab. 2.3: Anreicherungen der Tec1-, Msa1- und Msa2-regulierten Gene für GO-Terms und Bindung durch Transkriptionsfaktoren

Die Anzahlen der positiv und negativ regulierten Gene sind in Klammern angegeben, ebenso wie die p-Werte bei der GO-Term-Anreicherung und Transkriptionsfaktor- (TF-) Bindung.

Klasse	Regulation	GO-Term-Anreicherung	TF-Bindung
Tec1-reguliert	positiv (40 Gene)	Fe ²⁺ -Bindung/-transport ($p < 10^{-7}$)	Tec1 ($p < 10^{-4}$) Aft1 ($p < 10^{-4}$)
	negativ (607 Gene)	Aminosäurebiosynthese ($p < 10^{-10}$) Ribosomenbiogenese ($p < 10^{-10}$) Transkription ($p < 10^{-7}$) Konjugation ($p < 10^{-7}$)	Gcn4 ($p < 10^{-10}$) Gln3 ($p < 10^{-10}$) Hap1 ($p < 10^{-2}$) Ste12 ($p < 10^{-2}$)
Msa1-reguliert	positiv (8 Gene)	keine Anreicherung	
	negativ (91 Gene)	Aminosäurebiosynthese ($p < 10^{-5}$) Konjugation ($p < 10^{-3}$)	Gcn4 ($p < 10^{-5}$) Gln3 ($p < 10^{-3}$)
Msa2-reguliert	positiv (477 Gene)	Ribosomenstruktur ($p < 10^{-10}$) Translation ($p < 10^{-10}$) Membran ($p < 10^{-10}$) Mitochondrion ($p < 10^{-8}$) Proteasom ($p < 10^{-5}$) Nucleosom ($p < 10^{-4}$)	Fhl1 ($p < 10^{-5}$) Sfp1 ($p < 10^{-3}$) Rap1 ($p < 10^{-3}$) Hap1 ($p < 10^{-3}$) Rpn4 ($p < 10^{-3}$) Met31 ($p < 10^{-3}$)
	negativ (6 Gene)	keine Anreicherung	
Msa1-Msa2-reguliert	positiv (58 Gene)	Proteinfaltung ($p < 10^{-4}$) Zellwand ($p < 10^{-3}$)	Swi6 ($p < 10^{-5}$) Hsf1 ($p < 10^{-5}$) Mbp1 ($p < 10^{-4}$) Swi4 ($p < 10^{-3}$)
	negativ (38 Gene)	Hitzeschockantwort ($p < 10^{-7}$)	Msn2 ($p < 10^{-3}$) Msn4 ($p < 10^{-3}$)

Um mehr über die physiologischen Prozesse zu erfahren, die durch Tec1, Msa1 und Msa2 gesteuert werden, wurden die regulierten Gene auf Anreicherungen für bestimmte "Gene Ontology Terms" (GO-Terms) und Bindung durch Transkriptionsfaktoren untersucht (Tab. 2.3). Diese Analyse wurde mit der Web-basierten Software "Ceres" (Morris *et al.*, 2010) durchgeführt. Tec1- und Msa1-regulierte Gene spielen eine Rolle bei der Aminosäurebiosynthese und der Konjugation.

Es gibt eine Anreicherung für eine Bindung der Msa1- und Tec1-regulierten Gene durch die Transkriptionsfaktoren Gcn4 und Gln3. Daher wurde zunächst überprüft, ob die Deletionsstämme ein verändertes Wachstum unter Aminosäuremangel zeigen. Dies erfolgte durch einen Wachstumstest auf SC-Agarplatten, die mit dem Histidin-Analogon 3-Aminotriazol (3-AT) supplementiert waren (Abb. 2.16A). 3-AT ist ein kompetitiver Inhibitor der Imidazol-Glycerolphosphat-Dehydratase, einem Enzym, das bei der Histidinbiosynthese eine wichtige Rolle spielt (Hinnebusch, 1992). Zellen, die auf 3-AT wachsen, leiden also unter Histidinmangel, der dann die generelle Aminosäurekontrolle aktiviert (Wolfner *et al.*, 1975).

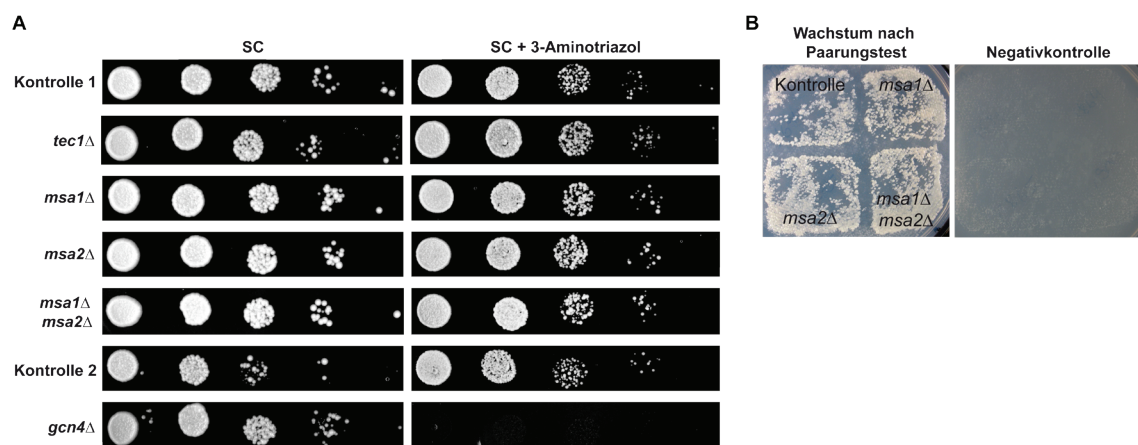


Abb. 2.16: Überprüfung der *tec1Δ*-, *msa1Δ*- und *msa2Δ*-Stämme auf Wachstum unter Aminosäuremangel und auf Konjugationsfähigkeit

A) Wachstum der *tec1Δ*-, *msa1Δ*- und *msa2Δ*-Stämme auf 3-AT. Verschiedene Verdünnungen (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10.000) exponentiell wachsender Kulturen von Hefestämmen YHUM1694 (Kontrolle 1), YHUM1700 (*tec1Δ*), YHUM1864 (*msa1Δ*), YHUM1865 (*msa2Δ*), YHUM1900 (*msa1Δ msa2Δ*), YHUM306 (Kontrolle 2) und YHUM913 (*gcn4Δ*) wurden auf SC – His-Agarplatten ohne und mit 10 mM 3-AT getropft und das Wachstum der Stämme nach 2-tägiger Inkubation fotografisch dokumentiert. **B)** Qualitativer Paarungstest mit den Hefestämmen YHUM1694 (Kontrolle), YHUM1864 (*msa1Δ*), YHUM1865 (*msa2Δ*) und YHUM1900 (*msa1Δ msa2Δ*). Diese MATa-Stämme wurden mit den Testerstämmen YHUM70 (MATα) oder YHUM69 (MATα, Negativkontrolle) gepaart. Die Selektion prototropher diploider *S. cerevisiae*-Zellen erfolgte auf YNB-Agarplatten.

Es ist allerdings kein Unterschied beim Wachstum der *tec1Δ*-, *msa1Δ*-, *msa2Δ*- und *msa1Δ msa2Δ*-Stämme auf 3-AT im Vergleich zu Medium ohne 3-AT sichtbar. Im Gegensatz dazu kann ein *gcn4Δ*-Stamm auf 3-AT gar nicht wachsen.

Da das Transkriptprofil zeigt, dass auch Konjugationsgene von Tec1 und Msa1 reguliert werden, wurde außerdem überprüft, ob die Deletionsstämme konjugationsfähig sind. Es wurde ein qualitativer Paarungstest mit *msa1Δ*-, *msa2Δ*- und *msa1Δ msa2Δ*-Stämmen durchgeführt (Abb. 2.16B), der jedoch keine veränderte Konjugationsfähigkeit der Stämme erkennen lässt.

In Tab. 2.3 fällt auf, dass Tec1 und Msa1 die meisten Gene negativ regulieren, während Msa2 einen stärkeren positiven Effekt auf die Genexpression hat. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Msa1 und Msa2 ihre Zielgene durch unterschiedliche Mechanismen kontrollieren. In der Doppelmutante sind sowohl positiv als auch negativ regulierte Gene in einem Verhältnis von ungefähr 60:40 zu finden. Bei Tec1 und Msa2 gibt es keine gemeinsamen GO-Term- und Transkriptionsfaktor-Anreicherungen (Tab. 2.3). Bei den Tec1-regulierten Genen gibt es eine starke Häufung von Genen für die Ribosomenbiogenese. Viele Msa2-regulierte Gene codieren für strukturelle Bestandteile von Ribosomen. Es besteht also die Möglichkeit, dass Tec1 und Msa2 gemeinsam die Ribosomenzahl regulieren, wenn auch durch unterschiedliche Mechanismen.

Interessanterweise gibt es eine nur sehr kleine Gruppe von 7 Genen, die von Msa1 und Msa2 gemeinsam reguliert werden, wenn man die *msa1Δ*- und *msa2Δ*-Einzelmutanten vergleicht (Abb. 2.15A). Bei gleichzeitiger Abwesenheit von Msa1 und Msa2 in der Doppelmutante werden jedoch 150 Gene differentiell exprimiert (Abb. 2.15B). Von diesen Genen sind 96 nur in der Doppelmutante betroffen. Dies ist ein überraschendes Ergebnis, da man aufgrund ihrer Verwandtschaft mehr funktionelle Überlappungen von Msa1 und Msa2 erwarten könnte. Diese 96 Msa1-Msa2-regulierten Gene sind vornehmlich für Proteinfaltung, Zellwand und Hitzeschockantwort von Bedeutung (Tab. 2.3). Zudem sind 13 dieser Gene auch Tec1-reguliert (Daten nicht gezeigt). Außerdem zeigen diese Resultate, dass von den 483 Genen, die in der *msa2Δ*-Einzelmutante mindestens 1,5-fach reguliert sind, 452 (94 %) in der Doppelmutante nicht verändert sind. Analog dazu werden 66 der 99 Msa1-regulierten Gene, was 67 % entspricht, in der Doppelmutante normal exprimiert. Das könnte bedeuten, dass Msa1 und Msa2 sich gegenseitig in ihrer Funktion bei der Zielgenkontrolle beeinflussen.

Die Transkriptanalysen bestätigen die funktionelle Interaktion von Tec1 mit Msa1 und Msa2 auch genomweit und geben Hinweise auf gemeinsam regulierte Prozesse.

2.2.5 Tec1, Ste12, Msa1 und Msa2 können verschiedene Komplexe ausbilden

Es stellte sich die Frage, ob der Tec1-Interaktionspartner Ste12 oder die MBF- und SBF-Bestandteile Mbp1 und Swi4 auch Teil der Komplexe zwischen Tec1, Msa1 und Msa2 sind. Um zu untersuchen, ob Ste12 mit Msa1 oder Msa2 interagiert, wurden Hefestämme verwendet, die endogen ProA-markiertes Msa1 oder Msa2 und Ste12-Myc tragen. Nach der Reinigung mit IgG-Sepharose wurde Ste12-Myc in der Ladekontrolle

(L) und in immunpräzipitierten Proteinkomplexen (IP) im Immunoblot mit Antikörpern gegen Myc nachgewiesen. Msa1-ProA und Msa2-ProA wurden mit Sekundärantikörpern (Donkey anti-Goat) detektiert.

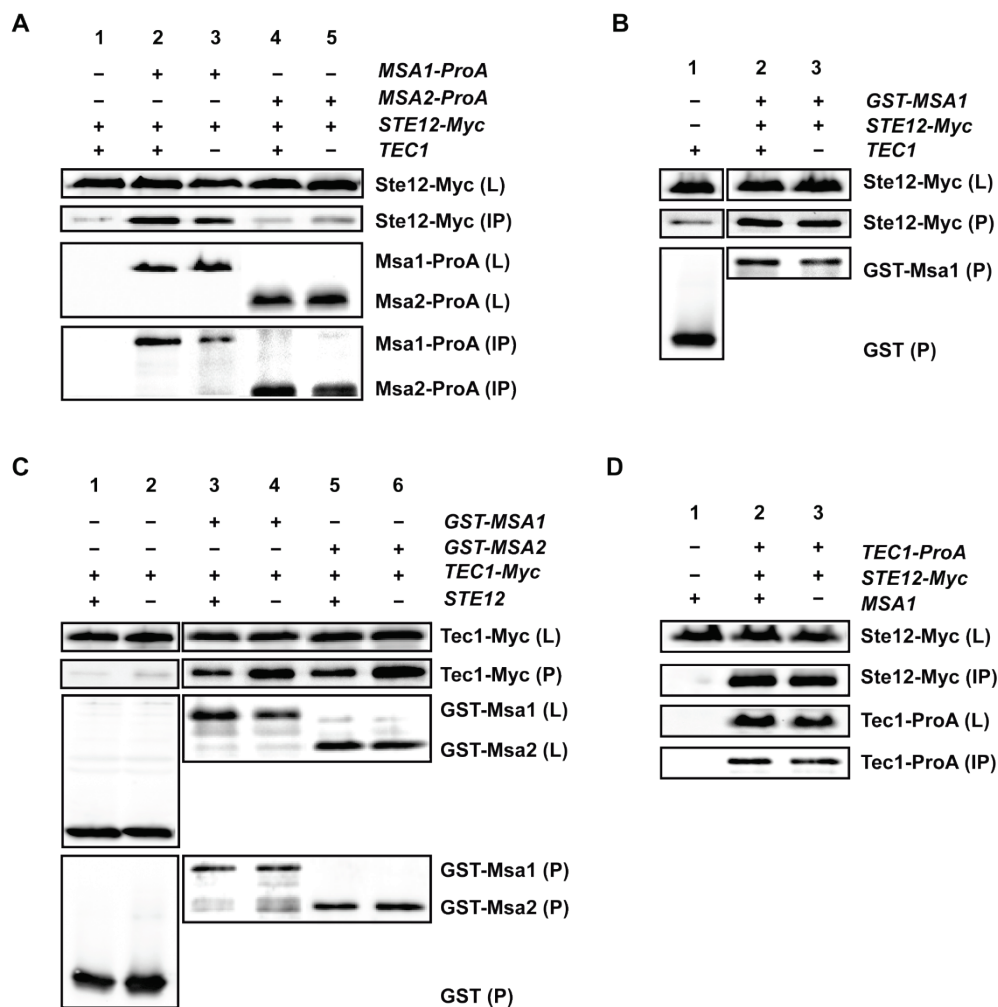


Abb. 2.17: Analyse der Komplexe zwischen Tec1, Ste12, Msa1 und Msa2

A) Interaktion zwischen Ste12, Msa1 und Msa2. Von Hefestämmen YHUM2168 (*STE12-Myc*) (1), YHUM2153 (*STE12-Myc MSA1-ProA*) (2), YHUM2161 (*STE12-Myc MSA1-ProA tec1Δ*) (3), YHUM2157 (*STE12-Myc MSA2-ProA*) (4) und YHUM2164 (*STE12-Myc MSA2-ProA tec1Δ*) (5) wurden Proteinextrakte hergestellt und Myc- und ProA-markierte Proteine in der Ladekontrolle (L) und in immunpräzipitierten Proteinkomplexen (IP) wurden vor und nach der ProA-vermittelten Affinitätsreinigung im Immunoblot mit Antikörpern gegen Myc oder mit Sekundärantikörpern (Donkey anti-Goat) nachgewiesen. **B)** Tec1-abhängige Interaktion zwischen Ste12 und Msa1. Verwendet wurden Hefestämme YHUM2168 (*STE12-Myc TEC1*) und YHUM2161 (*STE12-Myc tec1Δ*), die *GST* (1) oder *GST-MSA1* (2,3) exprimieren. Ste12-Myc in der Ladekontrolle (L) und in Gluthation-Agarose-gereinigten Proteinkomplexen (P) wurde mit Myc-Antikörpern detektiert, GST-Msa1 wurde mit GST-spezifischen Antikörpern nachgewiesen. **C)** Ste12-abhängige Interaktion zwischen Tec1, Msa1 und Msa2 in Hefestämmen RH2754 (*STE12*) und RH2755 (*ste12Δ*), die *GST* (1,2), *GST-MSA1* (3,4) oder *GST-MSA2* (5,6) zusammen mit *Myc-TEC1* (BHUM768) exprimieren. **D)** Msa1-abhängige Interaktion zwischen Tec1 und Ste12 in Hefestämmen YHUM2168 (*STE12-Myc*) (1), YHUM2169 (*TEC1-ProA STE12-Myc*) (2) und YHUM2170 (*TEC1-ProA STE12-Myc msa1Δ*) (3) verwendet.

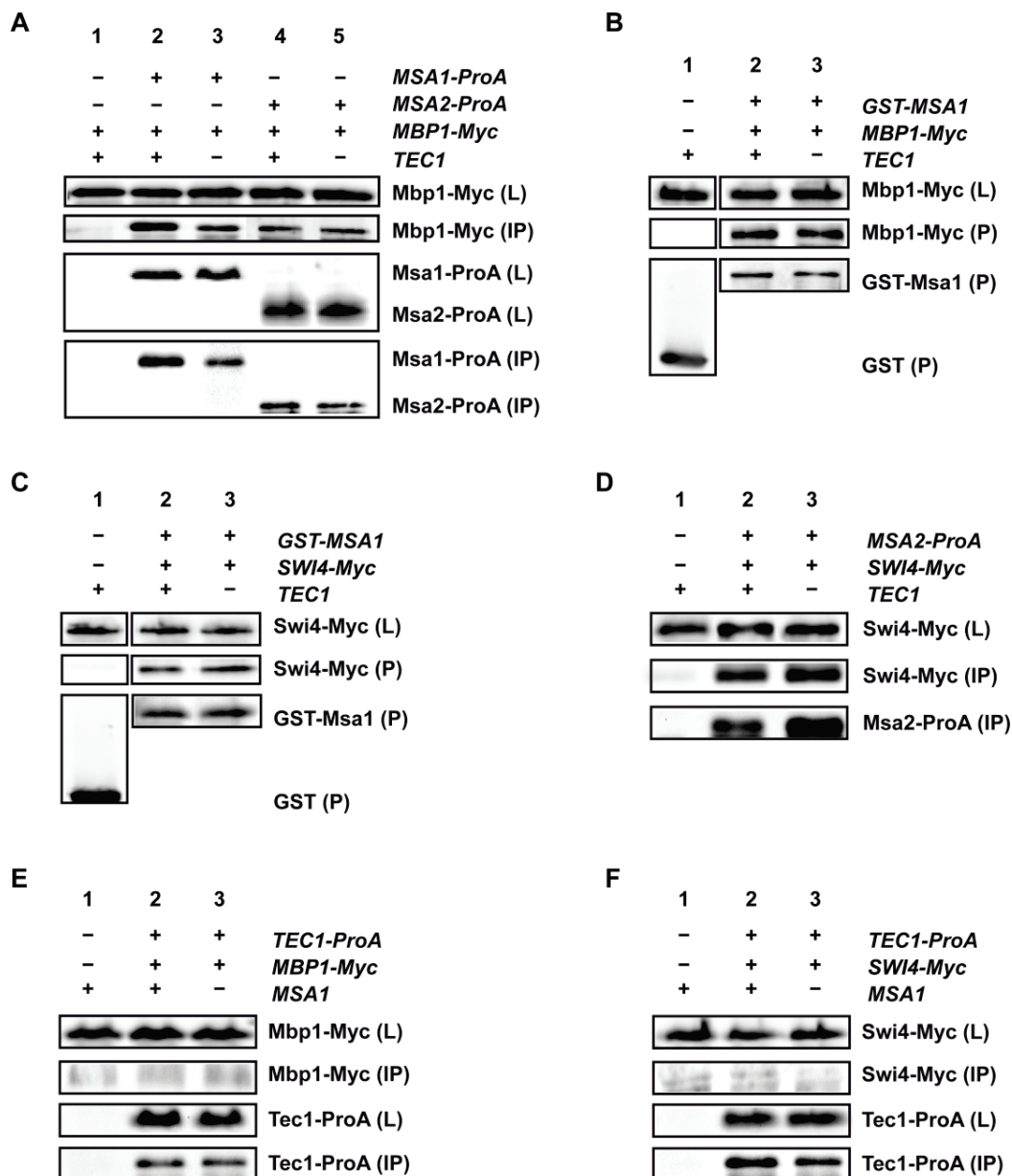


Abb. 2.18: Analyse der Komplexe zwischen Tec1, Msa1, Msa2, Mbp1 und Swi4

A) Tec1-abhängige Interaktion zwischen Mbp1 mit Msa1 und Msa2 in Hefestämmen YHUM2171 (*MBP1-Myc*) (1), YHUM2154 (*STE12-Myc MSA1-ProA*) (2), YHUM2162 (*MBP1-Myc MSA1-ProA tec1Δ*) (3), YHUM2158 (*MBP1-Myc MSA2-ProA*) (4) und YHUM2165 (*MBP1-Myc MSA2-ProA tec1Δ*) (5). **B)** Tec1-abhängige Interaktion zwischen Mbp1 und Msa1 in Hefestämmen YHUM2171 (*MBP1-Myc*) und YHUM2162 (*MBP1-Myc tec1Δ*), die *GST* (1) oder *GST-MSA1* (2,3) exprimieren. **C)** Tec1-abhängige Interaktion zwischen Swi4-Myc mit Msa1 in Hefestämmen YHUM2174 (*SWI4-Myc*) und YHUM2163 (*SWI4-Myc tec1Δ*), die *GST* (1) oder *GST-MSA1* (2,3) exprimieren. **D)** Tec1-abhängige Interaktion zwischen Swi4 und Msa2 in Hefestämmen YHUM2174 (*SWI4-Myc*) (1), YHUM2159 (*SWI4-Myc MSA2-ProA*) (2) und YHUM2166 (*SWI4-Myc MSA2-ProA tec1Δ*) (3). **E)** Msa1-abhängige Interaktion zwischen Mbp1-Myc und Tec1 in Hefestämmen YHUM2171 (*MBP1-Myc MSA1*) (1), YHUM2172 (*MBP1-Myc TEC1-ProA*) (2) und YHUM2173 (*MBP1-Myc TEC1-ProA msa1Δ*) (3). **F)** Msa1-abhängige Interaktion zwischen Swi4 und Tec1 in Hefestämmen YHUM2174 (*MBP1-Myc*) (1), YHUM2175 (*SWI4-Myc TEC1-ProA*) (2) und YHUM2176 (*SWI4-Myc TEC1-ProA msa1Δ*) (3).

In Abb. 2.17A ist zu sehen, dass Ste12 mit Msa1 co-präzipitiert werden kann, während es keine eindeutige Interaktion mit Msa2 aufweist. Die Ste12-Msa1-Interaktion konnte auch mit Plasmid-basiertem *GST-MSA1*, das in einem Hefestamm mit chromosomalem *STE12-MYC* eingebracht wurde, gezeigt werden (Abb. 2.17B). Die Ste12-Msa1-Interaktion ist nicht abhängig von Tec1 (Abb. 2.17AB). Umgekehrt ist die Tec1-Msa1- und die Tec1-Msa2-Interaktion nicht abhängig von Ste12 (Abb. 2.17C). Das Fehlen von Ste12 scheint sogar die Effizienz der Tec1-Msa1- und der Tec1-Msa2-Interaktion zu erhöhen. Außerdem konnte die Tec1-Ste12-Interaktion nicht durch die Abwesenheit von Msa1 verändert werden (Abb. 2.17D).

Die Interaktion von Msa1 mit der MBF-Komponente Mbp1 und die Interaktion von Msa1 und Msa2 mit der SBF-Komponente Swi4, die bereits in Ashe *et al.*, 2008 nachgewiesen wurde, wird durch die An- oder Abwesenheit von Tec1 nicht beeinflusst (Abb. 2.18A-D). Dabei macht es keinen Unterschied, ob *MSA1* und *MSA2* chromosomal oder von einem Plasmid aus exprimiert werden.

Ein neues Resultat ist die Interaktion zwischen Msa2 und Mbp1 (Abb. 2.18A). Tec1 kann jedoch nicht mit Mbp1 oder Swi4 assoziieren und ist somit nicht Bestandteil der Komplexe zwischen Msa1, Msa2 und MBF- und SBF-Komponenten (Abb. 2.18EF). Die Abwesenheit von Msa1 verändert dieses Ergebnis nicht.

Mit den hier durchgeführten Versuchen konnten mindestens 3 Komplexe zwischen Tec1, Ste12, Msa1 und Msa2 zusätzlich zum bekannten Tec1-Ste12-Komplex identifiziert werden: Tec1-Msa1, Tec1-Msa2 und Ste12-Msa1. Zudem wurde festgestellt, dass die Komplexe zwischen Msa1, Msa2, MBF und SBF kein Tec1 enthalten.

2.2.6 Tec1, Ste12, Msa1 und Msa2 binden in unterschiedlichen Kombinationen an gemeinsam regulierte Promotoren

Um zu verstehen, wie genau Tec1 und Ste12 zusammen mit Msa1 und Msa2 die Transkriptionsregulation ihrer Zielgene regulieren, wurden zunächst alle 106 Gene, die den Transkriptomanalysen zufolge durch Tec1 und Msa1 und/oder Msa2 reguliert werden, bioinformatisch genauer analysiert (Tab. A1 im Anhang). Es wurden solche Gene identifiziert, von denen bereits bekannt war, dass sie durch Tec1, Ste12, Dig1 oder Dig2 gebunden werden (Zeitlinger *et al.*, 2003; Harbison *et al.*, 2004; Chou *et al.*, 2006). Ergänzend dazu wurden Anwesenheit, Position und Orientierung hochaffiner

TCS-Elemente (RMATTCYY, Heise *et al.*, 2010) in den Promotorregionen der Gene aufgelistet. Des Weiteren wurden die Gene auf Bindung durch Mbp1 und Swi4 untersucht (Harbison *et al.*, 2004), da über diese, wenn nicht durch Tec1, Msa1 und Msa2 an die DNA gelangen können. Auch eine funktionelle Verbindung zum Zellzyklus wurde angegeben, wenn vorhanden. Basierend auf diesen Kriterien wurde eine Gruppe von Genen ausgewählt, die unter Kontrolle des Zellzyklus sind (*SRL3*), die Biofilmbildung regulieren (*FLO11*, *MSB2*) oder die Zellfusion bei der Konjugation vermitteln (*FUS1*). Diese Gene enthalten TCS-Elemente, PREs, MCBs oder SCBs in verschiedenen Kombinationen (Abb. 2.19 und Tab. 2.4).

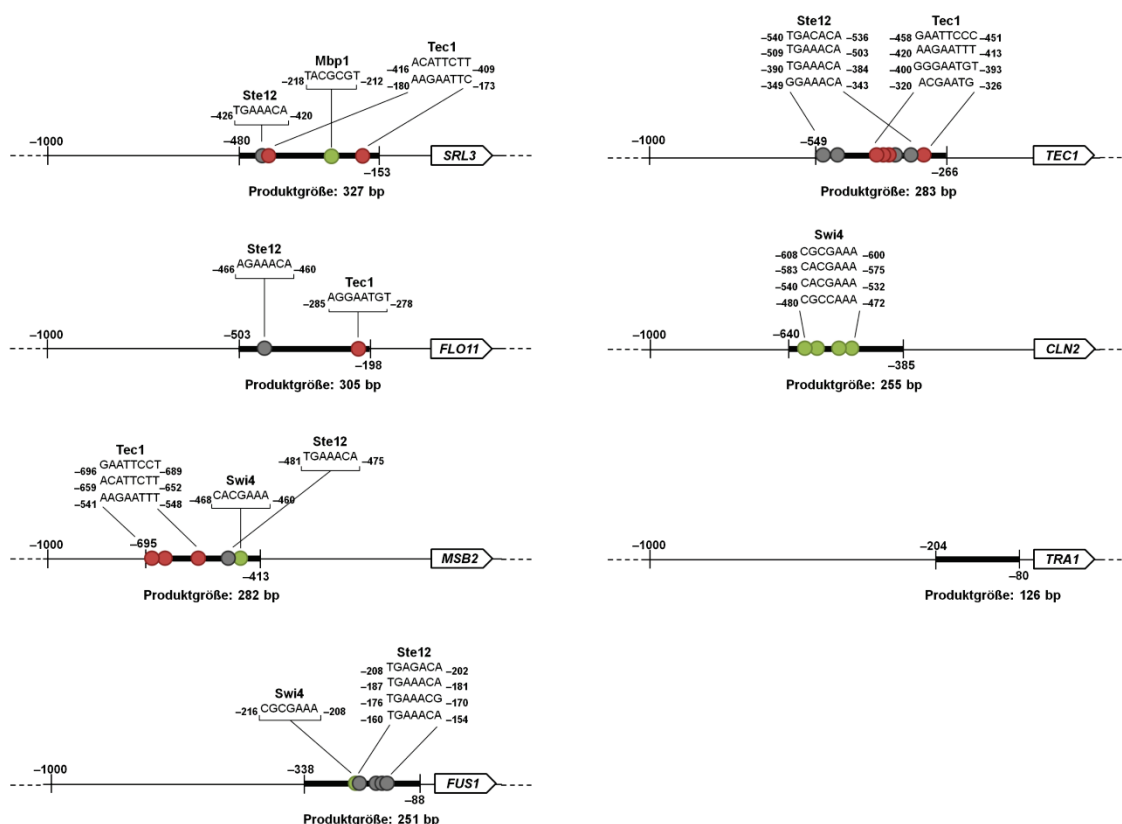


Abb. 2.19: Transkriptionsfaktor-Bindestellen in Promotoren von Genen, die in ChIP-Analysen charakterisiert wurden

Hervorgehoben sind die Promotorbereiche, die in den ChIP-Analysen mittels PCR amplifiziert wurden. In diesen sind die Transkriptionsfaktor-Bindestellen mit Sequenz und Position markiert. Die entsprechenden Konsensussequenzen sind in Tab. 2.4 angegeben. Eingezeichnet sind außerdem solche Bindestellen, die mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit von den Transkriptionsfaktoren gebunden werden, auch wenn sie geringe Abweichungen von der Konsensussequenz zeigen (Harbison *et al.*, 2004).

Die ausgewählten Gene wurden dann mittels Chromatin-Immunopäzipitation (ChIP) auf Bindung durch Tec1, Ste12, Msa1, Msa2, Mbp1 und Swi4 untersucht. Hierfür wurden *S. cerevisiae*-Stämme verwendet, die endogen Myc-markierte, funktionelle Versionen der Regulatoren trugen. Exponentiell wachsende Hefezellen wurden mit Formaldehyd

fixiert, um Protein-Protein- und Protein-DNA-Kreuzvernetzungen zu induzieren. Nach Fragmentierung des Chromatins in durchschnittlich 500 bp große Stücke wurden die gebundenen Proteine über ihre Myc-Markierung immunpräzipitiert und die Kreuzvernetzungen wurden wieder gelöst. Die Amplifikation relevanter Promotorregionen erfolgte mit gereinigter DNA als Matrize (Abb. 2.20).

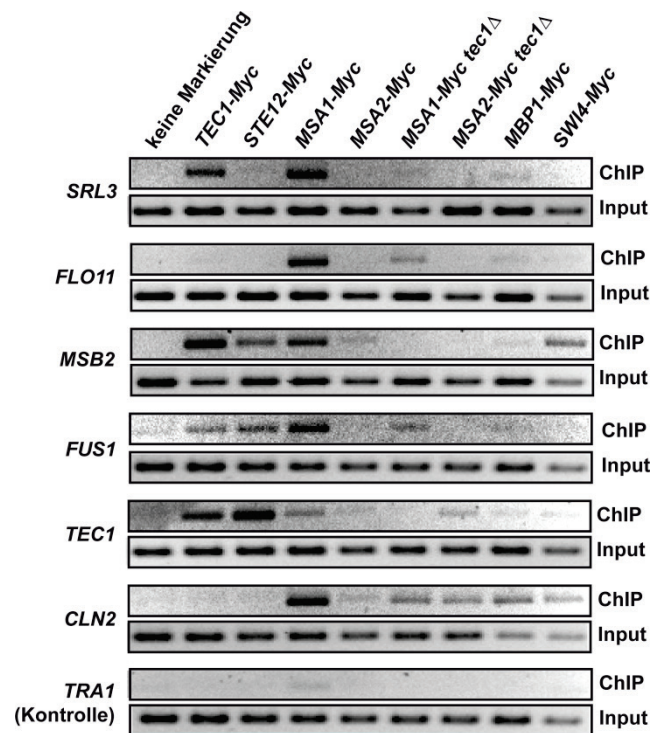


Abb. 2.20: Bindung von Tec1, Ste12, Msa1, Msa2, Mbp1 und Swi4 an die Promotoren von *SRL3*, *FLO11*, *MSB2*, *FUS1*, *TEC1*, *CLN2* und *TRA1*

Für die ChIP-Analysen wurden die Hefestämme YHUM1694 (keine Markierung), YHUM2167 (*TEC1-Myc*), YHUM2168 (*STE12-Myc*), YHUM2097 (*MSA1-Myc TEC1*), YHUM2098 (*MSA2-Myc TEC1*), YHUM2099 (*MSA1-Myc tec1Δ*), YHUM2100 (*MSA2-Myc tec1Δ*), YHUM2171 (*MBP1-Myc*) und YHUM2174 (*SWI4-Myc*) bis zu einer $OD_{600} = 1$ inkubiert und mit Formaldehyd fixiert, um Protein-DNA-Kreuzvernetzungen zu induzieren. Nach Fragmentierung des Chromatins in durchschnittlich 500 bp große Stücke mittels Ultraschall wurden die Proteine über ihre Myc-Markierung immunpräzipitiert und die Kreuzvernetzungen wieder gelöst. Die Amplifikation relevanter Promotorregionen von *FLO11*, *CLN2*, *MSB2*, *TEC1* und *SRL3* erfolgte mit 1/15 der immunpräzipitierten DNA (ChIP) und mit 1/2500 der Input-DNA (Input). Die PCR-Produkte wurden in 2%igen Agarosegelen aufgetrennt und mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. *TRA1*, *TEC1* und *CLN2* dienten als Kontrollen.

Als Kontrolle diente *TRA1*, das keine Bindestellen für Tec1, Ste12, Mbp1 oder Swi4 trägt (Abb. 2.20; Tab. 2.4). Erwartungsgemäß band keines der untersuchten Proteine an *TRA1*. *TEC1* wurde von Tec1 und Ste12 gebunden. Dieses Resultat stimmt mit dem einer früheren Studie überein, in der gezeigt wird, dass *TEC1* von Tec1 autoreguliert wird und durch Tec1 und Ste12 gebunden wird (Madhani & Fink, 1997). Ein anderes Bindungsmuster ist bei *CLN2* zu beobachten: *CLN2* wird effizient durch Msa1, Mbp1, Swi4 und schwach durch Msa2 gebunden (Abb. 2.20; Tab. 2.4). Interessanterweise ist

die Msa1-Bindung Tec1-abhängig, da eine schwächere Msa1-Bindung in Abwesenheit von *TEC1* zu sehen ist (Abb. 2.20).

Tab. 2.4: Transkriptionsfaktor-Bindung von Genen, die durch Tec1, Msa1 und Msa2 reguliert werden

Gen	Tec1		Ste12		Msa1		Msa2		Mbp1		Swi4	
	TCS ¹	ChIP-Bindung	PRE ²	ChIP-Bindung	ChIP-Bindung		ChIP-Bindung		MCB ³	ChIP-Bindung	SCB ⁴	ChIP-Bindung
					<i>TEC1</i>	<i>tec1Δ</i>	<i>TEC1</i>	<i>tec1Δ</i>				
<i>SRL3</i>	2	+	1	–	+	–	–	–	1	–	0	–
<i>FLO11</i>	1	–	1	–	+	+	–	–	0	–	0	–
<i>MSB2</i>	3	+	1	+	+	–	–	–	0	–	1	+
<i>FUS1</i>	0	+/-	4	+	+	+	–	–	0	–	1	–
<i>TEC1</i>	4	+	4	+	–	–	–	–	0	–	0	–
<i>CLN2</i>	0	–	0	–	+	+	+/-	+	0	+	4	+
<i>TRA1</i>	0	–	0	–	–	–	–	–	0	–	0	–

¹ RMAATTCYY (Heise *et al.*, 2010).

² TGAAACA (Badis *et al.*, 2008).

³ ACGCGTCA (Zhu *et al.*, 2009).

⁴ CRCGAAA (MacIsaac *et al.*, 2006).

Die anderen Gene wurden von den Proteinen in unterschiedlichen Zusammenstellungen gebunden. Am *SRL3*-Promotor waren Tec1 und Msa1 zu finden, jedoch keiner der anderen Regulatoren (Abb. 2.20; Tab. 2.4). Zudem war hier die Bindung von Msa1 ebenfalls Tec1-abhängig. Vermutlich wird *SRL3* durch einen Tec1-Msa1-Komplex gebunden, der über das TCS-Element an die DNA gelangt. Ein ähnliches Muster findet sich bei *FUS1*, allerdings ist hier Ste12 auch noch gebunden. Der *FUS1*-Promotor enthält mehrere PREs, jedoch kein TCS-Element (Abb. 2.19; Tab. 2.4).

Die untersuchte Region von *FLO11* hingegen weist nur die Bindung von Msa1 auf, obwohl der *FLO11*-Promotor TCS-Elemente und PREs enthält (Abb. 2.20; Tab. 2.4). Auch diese Msa1-Bindung ist Tec1-abhängig. Möglicherweise wird Msa1 durch ein weiteres, noch nicht identifiziertes DNA-Bindeprotein an *FLO11* rekrutiert.

MSB2 wird sowohl durch Tec1, Ste12 und Msa1, als auch durch Swi4 gebunden (Abb. 2.20; Tab. 2.4). Die Msa1-Bindung war in Abwesenheit von *TEC1* völlig aufgehoben. Der *MSB2*-Promotor enthält TCS-Elemente, PREs und SCB-Elemente.

Die Daten dieses Abschnitts zeigen, dass Tec1, Ste12, Msa1, Msa2, Mbp1 und Swi4 in unterschiedlichen Kombinationen an ihre Zielgene binden können. Vermutlich ist diese kombinatorische Transkriptionskontrolle promotorspezifisch.

2.2.7 Die C-terminale Domäne von Tec1 lässt sich nicht vollständig durch Msa1 oder Msa2 ersetzen

Nachdem die physiologische Bedeutung der Tec1-Msa1- und Tec1-Msa2-Interaktion näher beleuchtet wurde, war es außerdem interessant herauszufinden, welche direkten Funktionen Msa1 und Msa2 im Komplex mit Tec1 bei der Transkriptionsaktivierung ausüben. Aus diesem Grund wurden Tec1¹⁻²⁸⁰-Msa1- und Tec1¹⁻²⁸⁰-Msa2-Fusionen analog zu den Tec1¹⁻²⁸⁰-Ste12-Fusionen aus Abschnitt 2.1 und Heise *et al.*, 2010 hergestellt (Abb. 2.21).

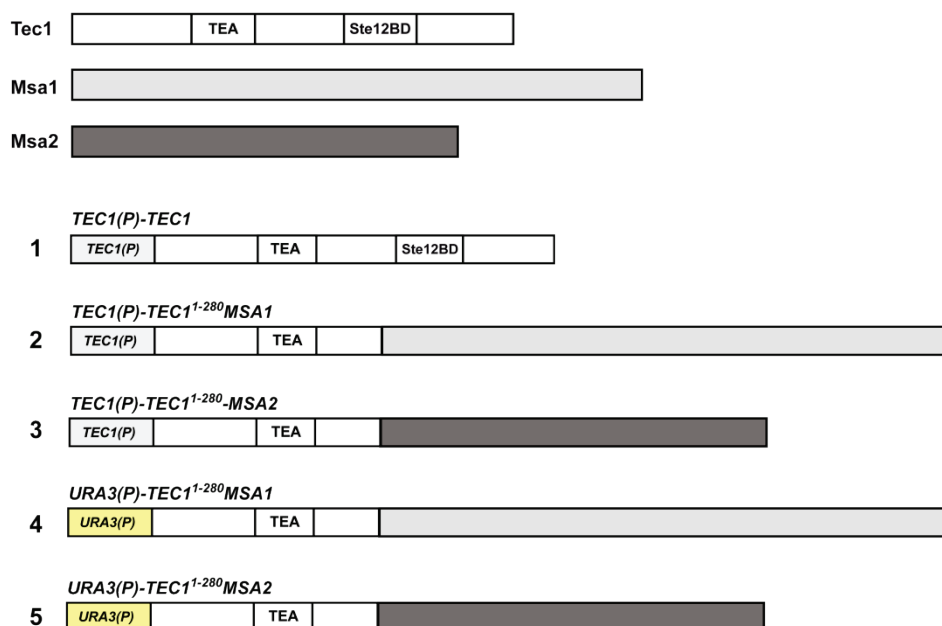


Abb. 2.21: Schematische Darstellung von Tec1, Msa1, Msa2 und verschiedener *TEC1-MSA*-Hybridkonstrukte. Dargestellt sind Schemata der Tec1-, Msa1- und Msa2-Proteine, von *TEC1* und verschiedenen *TEC1-MSA*-Hybridkonstrukte, die jeweils aus dem *TEC1*- oder dem *URA3*-Promotor, *TEC1¹⁻²⁸⁰* und dem *MSA1*- oder dem *MSA2*-Leserahmen bestehen.

Die Fusionsproteine wurden auf ihre Fähigkeit zur Ausübung Tec1-spezifischer Funktionen überprüft. Es wurden sowohl *TEC1(P)*-getriebene (Abb. 2.21, Konstrukte 2 und 3), als auch *URA3(P)*-getriebene Fusionsgene erstellt (Abb. 2.21, Konstrukte 4 und 5). Die Gene mit *URA3(P)* dienten zur zellzyklusunabhängigen Expression von *TEC1¹⁻²⁸⁰-MSA1* und *TEC1¹⁻²⁸⁰-MSA2*. Da auch die Msa1- und Msa2-Proteinmengen zellzyklusabhängig fluktuieren (Ashe *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008), sollte die Expression über den konstitutiven *URA3*-Promotor ausreichende Fusionsproteinmengen gewährleisten.

Konstrukte 2-5 wurden als einzelne genomische Kopien in einen *tec1Δ msa1Δ msa2Δ*-Stamm eingebracht. Als Vergleich diente ein Stamm mit *TEC1(P)-TEC1*, *MSA1* und *MSA2*. Die Fusionsproteine wurden zunächst im Immunoblot mit Tec1-spezifischen Antikörpern nachgewiesen (Abb. 2.22A). Die Proteinmengen in Stämmen mit *URA3(P)*-getriebenen Konstrukten sind etwas höher als in Stämmen mit *TEC1(P)*-getriebenen Konstrukten. Auffällig ist, dass bei Msa1- und bei Msa2-Fusionsproteinen jeweils Doppelbanden zu sehen sind. Die obere Bande stellt vermutlich jeweils das gesamte Fusionsprotein dar, während die untere Bande ein Abbruchfragment repräsentieren könnte, an das der Tec1-Antikörper ebenfalls binden kann.

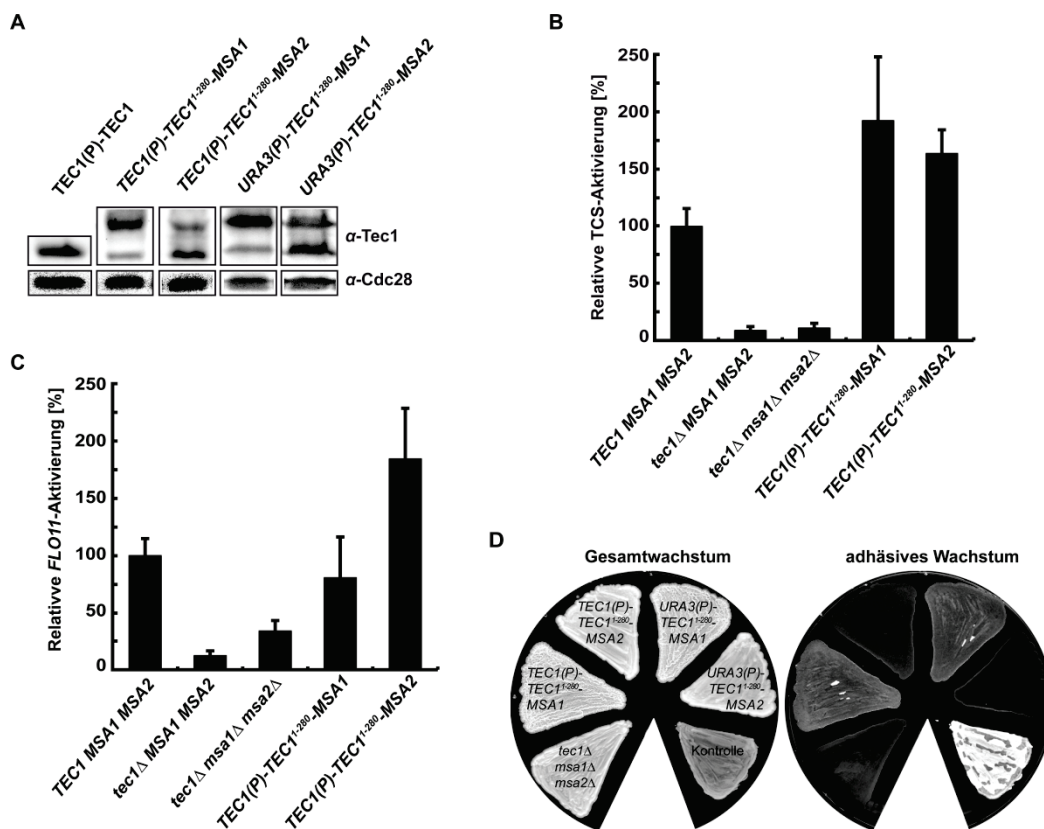


Abb. 2.22: Einfluss von Tec1¹⁻²⁸⁰-Msa1 und Tec1¹⁻²⁸⁰-Msa2 auf TCS-abhängige Zielgenaktivierung und Biofilmbildung

A) Immunoblot-Analyse von Tec1¹⁻²⁸⁰-Msa1 und Tec1¹⁻²⁸⁰-Msa2. Die Detektion der Fusionsproteine in Hefestämmen YHUM2027 (*TEC1(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-MSA1*), YHUM2028 (*TEC1(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-MSA2*), YHUM2029 (*URA3(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-MSA1*) und YHUM2030 (*URA3(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-MSA2*) erfolgte mit Tec1-spezifischen Antikörpern. Als Vergleich diente YHUM1694 (*TEC1(P)-TEC1*), interner Standard war Cdc28. **B)** Aktivierung eines 2×TCS-CFP-Reportergens in Hefestämmen YHUM2198 (Kontrolle), YHUM2187 (*tec1Δ*), YHUM2197 (*tec1Δ msa1Δ msa2Δ*), YHUM2183 (*TEC1(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-MSA1*) und YHUM2184 (*TEC1(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-MSA2*), bestimmt durch quantitative Fluoreszenzmikroskopie. Die Balken zeigen die relative TCS-Aktivierung, die im Kontrollstamm auf 100 % gesetzt wurde. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. **C)** Aktivierung eines *FLO11*-CFP-Reportergens in Hefestämmen YHUM2190 (Kontrolle), YHUM2195 (*tec1Δ*), YHUM2198 (*tec1Δ msa1Δ msa2Δ*), YHUM2191 (*TEC1(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-MSA1*) und YHUM2192 (*TEC1(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-MSA2*), bestimmt durch quantitative Fluoreszenzmikroskopie. Die Balken zeigen die relative *FLO11*-Aktivierung, die im Kontrollstamm auf 100 % gesetzt wurde. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. **D)** Adhäsives Wachstum der in A) angegebenen Hefestämme und der weiteren Kontrolle YHUM 1901 (*tec1Δ msa1Δ msa2Δ*), bestimmt nach Wachstum auf YPD. Die Platten wurden vor (Gesamtwachstum) und nach (adhäsives Wachstum) Entfernung der nicht-adhäsiven Zellen in einem Waschtest fotografiert.

Als Nächstes wurde die Fähigkeit der Fusionsproteine zur Transkriptionsaktivierung eines 2×TCS-*CYC1-CFP*-Reportergens (TCS-*CFP*; siehe auch Kapitel 2.3) überprüft. Ein Stamm mit *TEC1*, *MSA1* und *MSA2* diente als Referenz. Die TCS-*CFP*-Aktivierung in diesem Stamm wurde auf 100 % gesetzt (Abb. 2.22B). Weitere Kontrollen sind ein *tec1Δ*- und ein *tec1Δ msa1Δ msa2Δ*-Stamm, bei denen die TCS-*CFP*-Aktivierung nur bei 9 % bzw. 11 % im Vergleich zum *TEC1*-Stamm liegt.

Die Fusion von Tec1¹⁻²⁸⁰ mit Msa1 oder Msa2 hebt die TCS-vermittelte Transkriptionsaktivierung deutlich über das Niveau der Kontrolle mit nativem Tec1. Die relative TCS-*CFP*-Aktivierung von Tec1¹⁻²⁸⁰-Msa1 liegt bei etwa 190 %, die von Tec1¹⁻²⁸⁰-Msa2 bei ungefähr 165 % (Abb. 2.22B). Die Fähigkeit von Msa1 und Msa2 zur Transkriptionsaktivierung ist also höher als die von Tec1.

Die Transkriptionsaktivierung von *FLO11*, welches ein wichtiges Zielgen von Tec1 ist, beträgt im *tec1Δ*- und im *tec1Δ msa1Δ msa2Δ*-Stamm erwartungsgemäß nur 13 % bzw. 34 % der des Kontrollstamms mit *TEC1* (Abb. 2.22C). Mit Tec1¹⁻²⁸⁰-Msa1 lässt sich die Reporterogenaktivierung auf etwa 80 % des Kontrollwertes bringen. Fusioniert man Msa2 an Tec1¹⁻²⁸⁰, steigt die Aktivierung von *FLO11-CFP* sogar auf 185 %. Diese Resultate zeigen, dass Msa2 am *FLO11*-Promotor einen stärkeren Effekt bezüglich der Fähigkeit zur Transkriptionsaktivierung hat, wenn es über Tec1¹⁻²⁸⁰ an TCS-Elemente gebracht wird. Die Tec1¹⁻²⁸⁰-Msa1-Fusion kann das Fehlen von Tec1 zum Teil ersetzen. Bei den *MSA1*- und *MSA2*-Deletionsstämmen (Abschnitt 2.2.2) hatte das Fehlen von Msa1 einen stärkeren negativen Effekt auf die *FLO11*-Transkription und die Adhäsion an Agar. Die Adhäsion an Agar ist in einem *tec1Δ msa1Δ msa2Δ*-Stamm völlig aufgehoben (Abb. 2.22D). Bringt man Msa1 durch die Fusion mit Tec1₁₋₂₈₀ wieder in die Zelle (Konstrukte 2 und 4), können die entsprechenden Hefestämme wieder leicht an Agar adhären. Überraschenderweise konnten die Tec1¹⁻²⁸⁰-Msa2-Fusionen (Konstrukte 3 und 5) die Adhäsionsfähigkeit jedoch nicht zurückbringen, obwohl man dies aufgrund starken Aktivierung von *FLO11-CFP* (Abb. 2.22C) durch Tec1¹⁻²⁸⁰-Msa2 erwarten könnte.

Insgesamt decken sich die hier gewonnenen Daten mit den Resultaten von Titz *et al.*, 2006, die Msa1 und Msa2 als starke Transkriptionsaktivatoren identifizieren. Fusioniert man Msa1 oder Msa2 mit der DNA-Bindedomäne von Tec1, zeigen sich bei den *CFP*-Reportergenen promotorspezifische Unterschiede bei der Transkriptionsaktivierung durch Msa1 und Msa2.

Auch der Effekt der Fusionsproteine auf die Zellgröße wurde untersucht (Tab. 2.5). Wie bereits in Abschnitt 2.2.3 gezeigt, führt das Fehlen von Msa1, Msa2 oder beiden Proteinen zu einer Vergrößerung der Zellen. Das Fehlen von Tec1 hingegen führt zu kleineren Zellen.

Tab. 2.5: Einfluss von Tec1¹⁻²⁸⁰-Msa1 und Tec1¹⁻²⁸⁰-Msa2 auf die Zellgröße

Relative Zellvolumina von Hefestämmen mit *TEC1(P)-TEC1* (Konstrukt 1) und Deletionen von *TEC1*, *MSA1* und/oder *MSA2* aus Abb. 2.12 und von Hefestämmen mit *TEC1(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-MSA1* (Konstrukt 2; YHUM2027, YHUM2033), *TEC1(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-MSA2* (Konstrukt 3; YHUM2028, YHUM2035), *URA3(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-MSA1* (Konstrukt 4; YHUM2029, YHUM2032) und *URA3(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-MSA2* (Konstrukt 5; YHUM2030, YHUM2034) wurden mit dem Partikelanalysegerät "Multisizer™ 3" bestimmt. Die Prozentzahlen wurden berechnet aus den Medianwerten der Zellvolumina von mindestens drei Messungen, die ins Verhältnis zur Kontrolle (100 %) gesetzt wurden.

Stamm	Konstrukt	Transkriptionsfaktoren	Zellvolumen
<i>TEC1(P)-TEC1 MSA1 MSA2</i>	1	Tec1, Msa1, Msa2	100 %
<i>TEC1(P)-TEC1 msa1Δ MSA2</i>	1	Tec1, Msa2	105 %
<i>TEC1(P)-TEC1 MSA1 msa2Δ</i>	1	Tec1, Msa1	126 %
<i>TEC1(P)-TEC1 msa1Δ msa2Δ</i>	1	Tec1	133 %
<i>tec1Δ MSA1 MSA2</i>	–	Msa1, Msa2	85 %
<i>tec1Δ msa1Δ MSA2</i>	–	Msa2	101 %
<i>tec1Δ MSA1 msa2Δ</i>	–	Msa1	123 %
<i>tec1Δ msa1Δ msa2Δ</i>	–	–	148 %
<i>TEC1(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-MSA1 tec1Δ msa1Δ msa2Δ</i>	2	Tec1 ¹⁻²⁸⁰ -Msa1	142 %
<i>TEC1(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-MSA2 tec1Δ msa1Δ msa2Δ</i>	3	Tec1 ¹⁻²⁸⁰ -Msa2	101 %
<i>URA3(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-MSA1 tec1Δ msa1Δ msa2Δ</i>	4	Tec1 ¹⁻²⁸⁰ -Msa1	149 %
<i>URA3(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-MSA2 tec1Δ msa1Δ msa2Δ</i>	5	Tec1 ¹⁻²⁸⁰ -Msa2	107 %
<i>TEC1(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-MSA1 tec1Δ msa1Δ MSA2</i>	2	Tec1 ¹⁻²⁸⁰ -Msa1, Msa2	88 %
<i>TEC1(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-MSA2 tec1Δ MSA1 msa2Δ</i>	3	Msa1, Tec1 ¹⁻²⁸⁰ -Msa2	107 %
<i>URA3(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-MSA1 tec1Δ msa1Δ MSA2</i>	4	Tec1 ¹⁻²⁸⁰ -Msa1, Msa2	97 %
<i>URA3(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-MSA2 tec1Δ MSA1 msa2Δ</i>	5	Msa1, Tec1 ¹⁻²⁸⁰ -Msa2	91 %

MSA1 und *MSA2* sind bei der Regulation der Zellgröße epistatisch über *TEC1*, da die *MSA1*- und *MSA2*-Einzeldelationen teilweise den Effekt der *TEC1*-Deletion supprimieren können und da die *tec1Δ msa1Δ msa2Δ*-Dreifachmutante, ähnlich wie die *msa1Δ msa2Δ*-Doppelmutante, ein deutlich vergrößertes Zellvolumen von 148 % im Vergleich zur Kontrolle besitzt.

Das Einbringen von Msa1 durch die Fusion an Tec1¹⁻²⁸⁰ in einen *tec1Δ msa1Δ msa2Δ*-Stamm hat nahezu keinen negativen Effekt auf die Zellgröße. Die Zellen besitzen ein Volumen von 142 % relativ zur Kontrolle. Wird hingegen Tec1¹⁻²⁸⁰-Msa2 in diesen Hefestamm eingebracht, sind die Zellen mit 101 % bzw. 107 % ähnlich groß wie die Kontrolle bzw. ein *msa1Δ*- oder ein *tec1Δ msa1Δ*-Stamm. Auch hier zeigt sich, dass der Effekt von Msa2 auf die Zellgröße deutlich größer ist als der von Msa1. Es sind allerdings keine Unterschiede zwischen Stämmen mit *TEC1(P)*-getriebenen Konstrukten und solchen mit *URA3(P)*-getriebenen Konstrukten erkennbar.

Zellen mit *tec1Δ*, die ein natives Msa-Protein enthalten und bei denen das jeweils andere Msa-Protein über die Fusion mit Tec1¹⁻²⁸⁰ wieder eingebracht wird, sind mit 88-107 % insgesamt deutlich kleiner als die Dreifachmutante. Hier ist der additive negative Effekt von Msa1 und Msa2 auf die Zellgröße erkennbar, der auch bei den Deletionsstämmen aus Abschnitt 2.2.3 zu beobachten war. Vergleichsweise klein sind Zellen mit *TEC1(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-MSA1* und *URA3(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-MSA2*. Dass hier kein deutlicher Größenunterschied zwischen Zellen mit Tec1¹⁻²⁸⁰-Msa1 und solchen mit Tec1¹⁻²⁸⁰-Msa2 zu sehen ist, lässt darauf schließen, dass auch die zellzyklusspezifische Expression von *MSA1* und *MSA2* wichtig bei der Zellgrößenregulation ist.

Die C-terminale Domäne von Tec1 kann also nicht vollständig durch Msa1 und Msa2 ersetzt werden. Tec1, Msa1 und Msa2 führen jeweils eigene Funktionen bei der TCS-vermittelten Genexpression, der Regulation von *FLO11* und der Zellgrößenregulation aus. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die promotorspezifische Zielgenkontrolle dieser Transkriptionsfaktoren.

Insgesamt zeigen die Daten dieses Kapitels, dass Tec1 mit den Co-Regulatoren Msa1 und Msa2 physisch und funktionell interagiert. Msa1 und Msa2 beeinflussen die Tec1-vermittelte Genexpression und regulieren die Zellgröße negativ. Tec1 hingegen hat einen positiven Effekt auf die Zellgröße. Die genomweite Transkriptanalyse hat ergeben, dass Tec1, Msa1 und Msa2 Gene für Aminosäurebiosynthese, Konjugation und Ribosomensynthese gemeinsam regulieren können. Tec1, Ste12, Msa1 und Msa2 können untereinander verschiedene Komplexe ausbilden und in unterschiedlichen Kombinationen an co-regulierte Promotoren binden.

2.3 *In-vivo*-Analyse der Signaltransduktionsdynamik im Fus3/Kss1-MAPK-Modul

2.3.1 Aufbau eines Systems zur quantitativen Analyse der Signaltransduktion im Fus3/Kss1-MAPK-Modul

Um die Signalverarbeitung im Fus3/Kss1-MAPK-Modul *in vivo* und auf Einzelzelebene quantitativ untersuchen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Fluoreszenzmikroskopie-basiertes System aufgebaut, mit dem man parallel die Menge und Lokalisierung der Regulatoren Tec1, Ste12, Dig1 und Dig2, sowie die Transkriptionsaktivierung während der Differenzierungsprogramme Biofilmbildung und Konjugation mit Hilfe von Reportergenen messen kann. Die mit dem *in-vivo*-System gewonnenen Daten können zudem dazu genutzt werden, die Signaltransduktion des Fus3/Kss1-MAPK-Moduls mathematisch zu modellieren.

2.3.1.1 Endogene Markierung von Tec1, Ste12, Dig1 und Dig2 mit YFP und RFP

Für eine endogene Markierung der Regulatoren Tec1, Ste12, Dig1 und Dig2 mit gelb- und rotfluoreszierenden Proteinen wurde eine PCR-basierte Methode gewählt (Janke *et al.*, 2004). Diese Methode erlaubt es, Gene an ihrem natürlichen Lokus mit Leserahmen von z.B. YFP oder RFP zu fusionieren. Tec1, Ste12, Dig1 und Dig2 wurden jeweils an ihrem C-Terminus markiert. Alle Hefestämme mit markierten Regulatoren weisen unter dem Fluoreszenzmikroskop ein deutliches Signal auf, das, wie bei Transkriptionsregulatoren erwartet, im Zellkern lokalisiert (Abb. 2.23A). Die Markierung der Proteine hat offensichtlich keinen Einfluss auf ihre Funktion bei der Kontrolle der transkriptionellen Programme Biofilmbildung und Konjugation, da die Hefestämme noch zum adhäsiven Wachstum und zur Konjugation fähig sind (Abb. 2.23BC). Die C-terminale Markierung von Tec1 hat zudem keinen Einfluss auf seinen Abbau unter Pheromon (Abb. 2.23D).

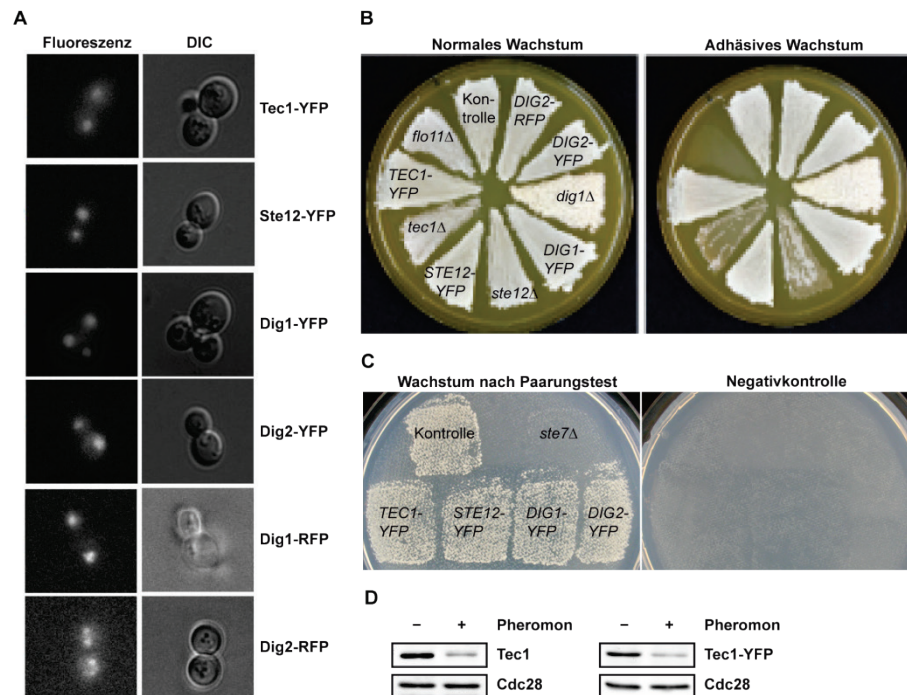


Abb. 2.23: Charakterisierung von Hefestämmen, die endogenen YFP- oder RFP-markiertes Tec1, Ste12, Dig1 oder Dig2 herstellen

A) Kernlokalisation des Fluoreszenzsignals. Gezeigt sind die Hefestämme YHUM1773 (*YFP-TEC1*), YHUM1774 (*YFP-STE12*), YHUM1775 (*YFP-DIG1*), YHUM1776 (*YFP-DIG2*), YHUM1777 (*RFP-DIG1*) und YHUM1778 (*RFP-DIG2*). Die Abbildung stammt aus Weisser, 2009. **B)** Adhäsionstest auf Agar mit den in A genannten Hefestämmen. Als Kontrollen dienten der Ausgangsstamm YHUM216 (Kontrolle) und YHUM1743 (*dig1Δ*), nicht-adhäsive Kontrollen waren YHUM924 (*flo11Δ*), YHUM610 (*tec1Δ*) und YHUM639 (*ste12Δ*). Die Abbildung stammt aus Weisser, 2009. **C)** Qualitativer Paarungstest mit den *MATa*-Hefestämmen YHUM1773 (*YFP-TEC1*), YHUM1774 (*YFP-STE12*), YHUM1775 (*YFP-DIG1*), YHUM1776 (*YFP-DIG2*). Als Positivkontrolle diente YHUM216 (Kontrolle), als nicht paarungsfähige Kontrolle YHUM811 (*ste7Δ*), die mit den Teststämmen YHUM70 (*MATa*) oder YHUM69 (*MATa*, Negativkontrolle) gepaart wurden. Die Selektion prototropher diploider *S. cerevisiae*-Zellen erfolgte auf YNB-Agarplatten. **D)** Immunoblot-Analyse zur Bestimmung der Tec1-Mengen nach Inkubation mit Pheromon. Kulturen von Hefestämmen YHUM1951 (Tec1) und YHUM1988 (Tec1-YFP) wurden bis zu einer $OD_{600nm} = 0,6$ angezogen und eine Probe wurde entnommen (– Pheromon), dann wurde jeweils 1 μM α -Faktor zugefügt und nach 5 min erneut eine Probe genommen (+ Pheromon). Tec1 wurde mit einem Tec1-spezifischen Antikörper nachgewiesen, als interne Kontrolle diente Cdc28.

2.3.1.2 Konstruktion und Überprüfung von programmspezifischen transkriptionellen CFP-Reportergenen

Die programmspezifischen transkriptionellen CFP-Reportergene sind modular aufgebaut. Sie bestehen aus einer austauschbaren Promotorregion, dem Leserahmen für CFP und dem *ADHI*-Terminator. Vor dem CFP-Leserahmen befindet sich eine Sequenz, die für Ubiquitin codiert (*UBI4*), ein Codon für ein N-Degron (*TAT* = Y (Tyrosin)) und ein Linker, der die Effizienz des N-Degrans moduliert (Δk) (Abb. 2.24). Dieses *Ubi-Y- Δk -CFP*-Gen, das für destabilisiertes CFP codiert, wird im Folgenden CFP genannt. Die Halbwertszeit der Fluoreszenz des destabilisierten CFP beträgt 5 min (Hackett *et al.*, 2006).

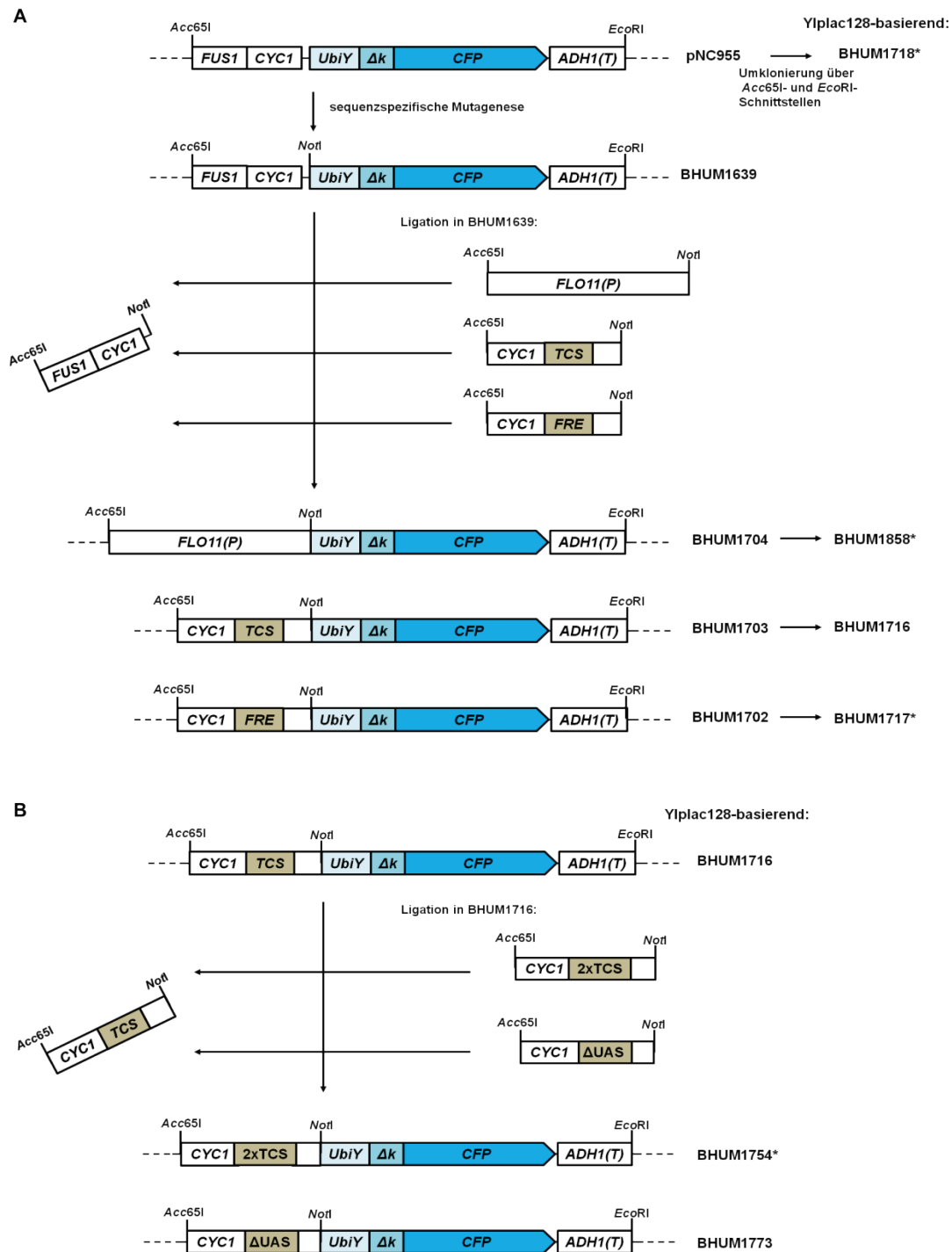


Abb. 2.24: Konstruktion von programmspezifischen transkriptionellen CFP-Reportergenen

A) In pNC955 wurde mittels sequenzspezifischer Mutagenese eine *NotI*-Schnittstelle hinter das *CFP*-Startcodon eingeführt, wobei BHUM1639 entstand, in dem die Promotorregion über *Acc65I*- und *NotI*-Stellen ausgetauscht werden kann. Hierzu wurde ein *FLO11(P)*-Fragment (2980 bp) aus BHUM170, ein TCS-*CYC1*-Element (670 bp) aus BHUM164 und ein FRE-*CYC1*-Element (690 bp) aus BHUM212 mit flankierenden *Acc65I*- und *NotI*-Stellen amplifiziert, die dann in BHUM1639 ligiert wurden, wobei BHUM1702-1704 entstanden. Die Reportergene TCS-*CFP*, FRE-*CFP*, *FUS1*-*CFP* und *FLO11*-*CFP* wurden anschließend über *Acc65I*- und *EcoRI*-Stellen in das *LEU2*-basierte integrative Plasmid Yiplac128 kloniert. **B)** Herstellung von 2×TCS-, 5×TCS- und ΔUAS-*CFP*-Reportergenen in Yiplac128-basierten Plasmiden. Das 2×TCS-*CYC1*-Element (690 bp) aus BHUM175 und das 5×TCS-*CYC1*-Element (750 bp) aus BHUM172 wurden amplifiziert und in BHUM1716 ligiert, wobei BHUM1754 und BHUM1759 entstanden. Ein *CYC1*(ΔUAS)-Element (650 bp) wurde aus BHUM1176 amplifiziert und in BHUM1716 ligiert, wobei BHUM1773 entstand. Die *-gekennzeichneten Plasmide wurden für quantitative Messungen in Abschnitt 2.3.2 verwendet.

Das hier als Ausgangsplasmid verwendete, integrative pNC955 (Hackett *et al.*, 2006), enthält den *CFP*-ORF und als Promotor die *FUS1(P)*-UAS ("upstream activation sequence") fusioniert mit der TATA-Box des *CYCI*-Promotors (455 bp) (Abb. 2.24A). Das im Folgenden als *FUS1-CFP* bezeichnete Gen diente als konjugationsspezifisches Reportergen. Um Reportergene mit austauschbaren Promotorregionen zu erhalten, wurde mit Hilfe von sequenzspezifischer Mutagenese eine *NotI*-Schnittstelle in pNC955 direkt hinter das *CFP*-Startcodon eingeführt (Abb. 2.24A). Das Produkt dieser Mutagenese ist BHUM1639. Für die Konstruktion von biofilmspezifischen Reportergenen kann nun die Promotorregion von *CFP* durch einen *Acc65I/NotI*-Restriktionsverdau ausgetauscht werden. Biofilm-spezifische Reportergene enthalten sowohl *FLO11(P)*, als auch einzelne TCS-Elemente oder FREs. Mit Hilfe von Primern, die jeweils am 5'-Ende des PCR-Produkts eine *Acc65I*- und am 3'-Ende eine *NotI*-Schnittstelle generierten, wurde ein *FLO11(P)*-Fragment (2980 bp) aus BHUM170 (Rupp *et al.*, 1999), ein TCS-*CYCI*-Element (670 bp) aus BHUM164 und ein FRE-*CYCI*-Element (690 bp) aus BHUM212 (Madhani und Fink 1997) amplifiziert (Abb. 2.23A). Das TCS-*CYCI*-, das FRE-*CYCI*- Fragment und *FLO11(P)* wurden dann in das *CFP*-tragende BHUM1639 kloniert, wobei BHUM1702-1704 entstanden. Die Reportergene TCS-*CYCI-CFP*, FRE-*CYCI-CFP* und *FLO11(P)-CFP* werden nachfolgend TCS-*CFP*, FRE-*CFP* und *FLO11-CFP* genannt.

Da sich herausstellte, dass sich pNC955 nur schlecht in das Hefegenom integrieren ließ, wurden die beschriebenen Reportergene inklusive *ADHI(T)* über ihre *Acc65I/EcoRI*-Schnittstellen in das *LEU2*-basierende, integrative Plasmid YIplac128 umkloniert. Es entstanden BHUM1716 (TCS-*CFP*), BHUM1717 (FRE-*CFP*), BHUM1718 (*FUS1-CFP*) und BHUM1858 (*FLO11-CFP*) (Abb. 2.24A). Nach Verdau mit *BstEII* wurden die Plasmide in Hefestämme integriert, die bereits fluoreszenzmarkierte Versionen von Tec1 und/oder Stel2 trugen. Die Integration wurde mit Hilfe der Southern-Hybridisierung unter Verwendung einer *CFP*-spezifischen Sonde verifiziert. Die Funktionalität der Reporter wurde anschließend im Fluoreszenzmikroskop überprüft. Hierfür wurden die Hefestämme zuerst in LFM angezogen und dann Kulturschälchen mit Glasboden übertragen, in die ebenfalls LFM gegeben wurde. Die Kulturschälchen ermöglichen die mikroskopische Beobachtung von Zellen unter guten Nährstoffbedingungen, erlauben aber auch einen Wechsel des Mediums oder die Zugabe verschiedener Chemikalien. Lebende Zellen werden mit dem Lektin

Concanavalin A an den Glasboden der Schälchen gebunden, sodass sie zwar fixiert sind, aber keinen weiteren Manipulationen ausgesetzt sind. Nach 30-minütiger Inkubation der Zellen in den Kulturschälchen wurden je 2 μ M α -Faktor oder Methanol als Kontrolle zugegeben und für 2 h inkubiert. Dann wurden die Zellen im Durchlicht (DIC) und im CFP-Kanal fotografiert. Es wurden je 6 Bilder pro Stamm und Bedingung aufgenommen, die mit dem Programm "ImageJ" quantifiziert wurden (Abb. 2.25).

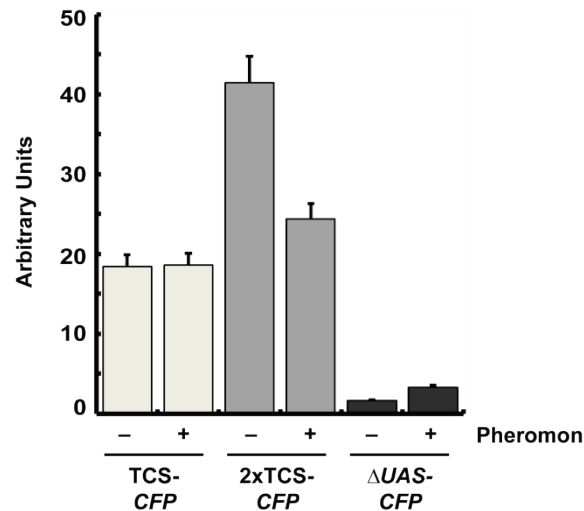


Abb. 2.25: Vergleich verschiedener TCS-getriebener CFP-Reportergene und eines Δ UAS-Reporters unter vegetativen Bedingungen und unter Konjugationsbedingungen

Balkendiagramm der Transkriptionsaktivierung folgender Reportergene: TCS-CFP (YHUM1911), 2xTCS-CFP (YHUM1950) und Δ UAS-CFP (YHUM1972). Zellen aus LFM-Flüssigkulturen wurden in Mikroskopieschälchen übertragen und für 2 h ohne (– Pheromon) oder mit 1 μ M α -Faktor (+ Pheromon) inkubiert und anschließend im Durchlicht (DIC) und im CFP-Kanal fotografiert. Die Fluoreszenz-Bilder wurden quantifiziert und der Hintergrund (Hefestamm ohne fluoreszenzmarkierte Proteine) subtrahiert. Die Werte sind Durchschnittswerte aus 6 Mikroskopie-Bildern mit je 20-50 Zellen. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

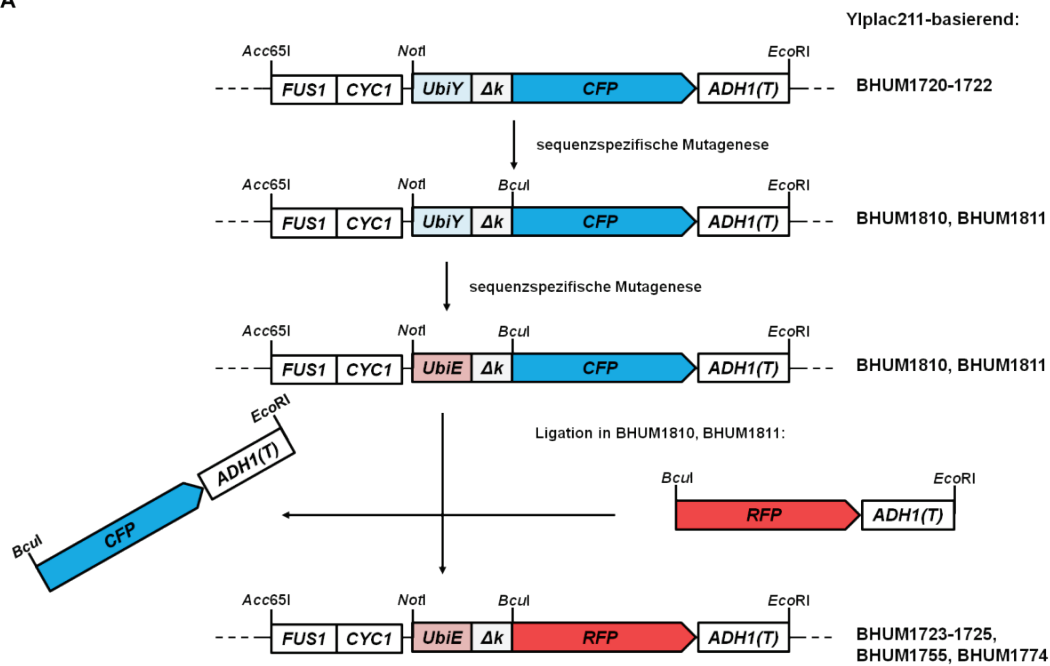
Um die Stärke der basalen Transkriptionsaktivierung des *CYC1*-Promotorelements zu bestimmen, wurde ein CFP-Reporter konstruiert, der ein *CYC1*(Δ UAS)-Element (650 bp) aus BHUM1176 enthält. Dieses Element wurde über die angefügten *Acc65I*- und *NotI*-Schnittstellen in BHUM1716 ligiert, wobei BHUM1773 entstand (Abb. 2.24B). Die basale Aktivierung dieses als Δ UAS-CFP bezeichneten Reportergens war sehr gering, sodass sie vernachlässigt werden konnte. Beim TCS-CFP-Reporter ist ein vergleichsweise schwaches Signal vorhanden, das sich auch bei pheromon-induziertem Tec1-Abbau nicht verändert. Aus diesem Grund wurden zusätzlich Reportergene konstruiert, die ein 2xTCS- oder ein 5xTCS-Element enthielten, was die Transkriptionsaktivierung erhöhen sollte. Hierfür wurde das 2xTCS-*CYC1*-Element (690 bp) aus BHUM175 und das 5xTCS-*CYC1*-Element (750 bp) aus BHUM172 amplifiziert, wobei 5'-*Acc65I*- und 3'-*NotI*-Schnittstellen angefügt wurden

(Abb. 2.24B). Die Promotorelemente wurden in BHUM1716 ligiert, in welchem sie das TCS-*CYCI*-Element ersetzen. Es entstanden BHUM1754 und BHUM1759. Mit dem 5×TCS-Element war keine Dynamik der *CFP*-Transkriptionsaktivierung zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Beim 2×TCS-Element ist die *CFP*-Transkriptionsaktivierung fast doppelt so stark wie die des einzelnen TCS-Elements. Zudem kann man eine deutliche Abnahme der Transkription unter Pheromoneinwirkung beobachten (Abb. 2.25), weshalb nur dieser 2×TCS-Reporter für die weiteren Messungen verwendet wurde.

2.3.1.3 *RFP- und YFP-Reportergene eignen sich nicht für die Analyse der Dynamik programmspezifischer Transkriptionsaktivierung*

Ein weitere Möglichkeit zur Nutzung des *in-vivo*-Messsystems ist theoretisch die parallele Messung der Transkriptionsaktivierung zweier unterschiedlicher Reporter in derselben Zelle. Zu diesem Zweck wurden programmspezifische *RFP*-Reportergene generiert. RFP hat eine vergleichsweise lange Maturierungszeit, die für das hier verwendete, relativ hell leuchtende tagRFP-Monomer 200 min beträgt (Merzlyak *et al.*, 2007). Das bisher zur Destabilisierung von CFP verwendete Ubi-Y-Δk-Abbausignal bewirkt einen schnellen Abbau des Proteins, sodass die fluoreszierenden Eigenschaften von RFP aufgrund der langen Maturierung vermutlich gar nicht erst ausgebildet werden können. Aus diesem Grund wurde mittels sequenzspezifischer Mutagenese das N-Degron (*TAT* = Y) durch ein Glutaminsäurecodon (*GAA* = E) ersetzt. Proteine mit dieser Modifikation sollten eine Halbwertszeit von 50 min haben (Hackett *et al.*, 2006). Zunächst wurden *FUSI-CFP-ADHI(T)* (1705 bp), *TCS-CFP-ADHI(T)* (1920 bp) und *FRE-CFP-ADHI(T)* (1990 bp) aus pNC955, BHUM1716 und BHUM1717 über *Acc65I*- und *EcoRI*-Schnittstellen in das *URA3*-basierende Plasmid YIplac211 kloniert, wobei BHUM1720-1722 entstanden (Abb. 2.26A). In diesen Plasmiden wurde dann mittels sequenzspezifischer Mutagenese eine *BcuI*-Schnittstelle vor dem ersten Codon von *CFP* generiert. Hierbei entstanden unter anderem BHUM1810 (*FRE-CFP*) und BHUM1811 (*FUSI-CFP*). Die Plasmide mit der *BcuI*-Stelle dienten als Matrize für die Mutagenese-PCR zur Umwandlung des Tyrosincodons in ein Glutaminsäurecodon. Über *BcuI/EcoRI*-Schnittstellen wurde dann ein *RFP-ADHI(T)*-Fragment (905 bp) aus BHUM1719 in die Plasmide kloniert, wobei BHUM1723-BHUM1725 entstanden (Abb. 2.25A). Außerdem wurden ein 2×TCS-Element und ein ΔUAS-Element in BHUM1723 kloniert (BHUM1755 und BHUM1774).

A



B

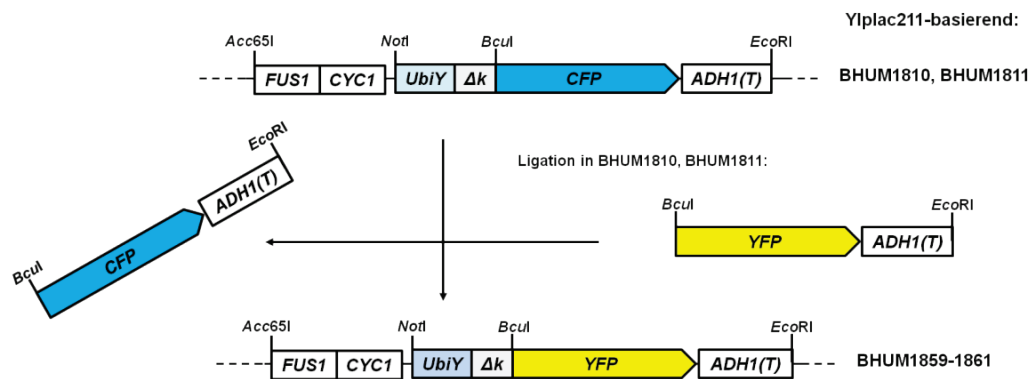


Abb. 2.26: Konstruktion von programmspezifischen transkriptionellen *RFP*- und *YFP*-Reportergenen

A) Strategie der Herstellung von programmspezifischen transkriptionellen *RFP*-Reportergenen. *FUS1*-*CFP*-*ADH1(T)* (1705 bp), *TCS*-*CFP*-*ADH1(T)* (1920 bp) und *FRE*-*CFP*-*ADH1(T)* (1990 bp) aus pNC955, BHUM1716 und BHUM1717 über *Acc65I*- und *EcoRI*-Schnittstellen in das *URA3*-basierende Plasmid Ylplac211 kloniert, wobei BHUM1720-1722 entstanden. Mittels sequenzspezifischer Mutagenese wurde in diesen Plasmiden eine *BclI*-Schnittstelle vor dem ersten Codon von *CFP* generiert. Hierbei entstanden unter anderem BHUM1810 (*FRE*-*CFP*) und BHUM1811 (*FUS1*-*CFP*). In BHUM1810 und BHUM1811 wurde anschließend mit sequenzspezifischer Mutagenese das Tyrosin-Codon hinter der *UBI4*-Sequenz (*TAT*=Y) durch ein Glutaminsäure-Codon (*GAA*=E) ersetzt. Über die *BclI*-/*EcoRI*-Stellen wurde dann ein *RFP*-*ADH1(T)*-Fragment (905 bp) aus BHUM1719 eingebracht. Es entstanden BHUM1723-BHUM1725. Außerdem wurde ein 2×*TCS*-Element und ein *CYC1*(*ΔUAS*)-Element jeweils in BHUM1723 kloniert, um BHUM1755 und BHUM1774 zu erhalten. **B)** Ein *YFP*-*ADH1(T)*-Fragment wurde aus dem Plasmid pCM29-1 amplifiziert, wobei *BclI*- und *EcoRI*-Schnittstellen angefügt wurden, über die das Fragment in BHUM1810 und BHUM1811 ligiert wurde. Zudem wurde in BHUM1860 das *FRE*-*CYC1*-Element durch das *CYC1*(*ΔUAS*)-Element ersetzt, wobei BHUM1861 entstand.

Nach Verdau mit *EcoRV* wurden die Plasmide in Hefestämme integriert, die bereits fluoreszenzmarkierte Versionen von Tec1 und/oder Ste12 und ein *CFP*-Reportergen trugen. Die Integration wurde mit Hilfe der Southern-Hybridisierung unter Verwendung einer *RFP*-spezifischen Sonde überprüft.

Die experimentelle Überprüfung eines *FUS1-RFP*-Reporters unter Pheromon-einwirkung ergibt, dass die Reaktionszeit des im Vergleich zu dem *FUS1-CFP*-Reporter langsamer und seine Aktivierung schwächer war (Abb. 2.27A).

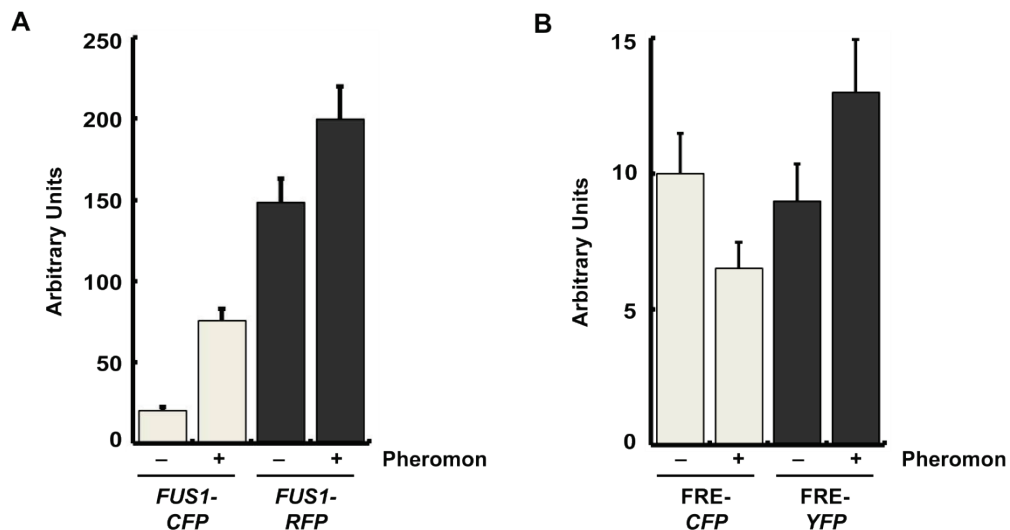


Abb. 2.27: Transkriptionsaktivierung von *RFP*- und *YFP*-Reportergenen unter vegetativen Bedingungen und Konjugationsbedingungen

A) Transkriptionsaktivierung von *FUS1*-Reportergenen in YHUM1957 (*FUS1-CFP*, *FUS1-RFP*). Die Werte sind Durchschnittswerte aus 10 Mikroskopie-Bildern mit je 20-50 Zellen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. **B)** Transkriptionsaktivierung von *FRE-CFP* (YHUM1915) und *FRE-YFP* (YHUM1958). Für Details zum Versuchsablauf siehe Abb. 2.25. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus zwei unabhängigen Messungen.

Bei *FUS1-CFP* ist in diesem Funktionstest eine etwa 4-fache Aktivierung unter Pheromon zu beobachten, *FUS1-RFP* steigt nur ungefähr 1,3-fach an. Als direkter Vergleich zu CFP-Reportern in denselben Zellen sind *RFP*-Reportergene also ungeeignet.

Schließlich wurden *YFP*-Reportergene konstruiert, da das verwendete Citrine-YFP wie CFP eine ähnlich kurze Maturierungszeit von einigen Minuten hat (Nagai *et al.*, 2002). Ein *YFP-ADH(T)*-Fragment wurde aus pCM29-1 amplifiziert, wobei *BcuI*- und *EcoRI*-Schnittstellen angefügt wurden, über die das Fragment in die Zielpasmide BHUM1810 und BHUM1811 ligiert wurde (Abb. 2.26B). Es entstanden BHUM1859 (*FRE-YFP*) und BHUM1860 (*FUS1-YFP*). Parallel wurde in BHUM1860 das *FRE-CYCI*-Element durch das *CYCI(AUAS)*-Element ersetzt, wobei BHUM1861 entstand.

Die Überprüfung der Integration der *YFP*-Reportergene durch Southern-Hybridisierung war mit einer *YFP*-spezifischen Sonde nicht möglich, weil die *CFP*- und *YFP*-Leserahmen bis auf einige Basen in den Fluorophor-codierenden Regionen identisch sind. Die Verwendung einer *URA3*-spezifischen Sonde erbrachte auch kein eindeutiges

Ergebnis, da das *URA3*-Gen in den verwendeten Hefestämmen nicht deletiert ist, sondern sein Leserahmen durch eine Transposon-Insertion unterbrochen ist. Die *URA3*-Sonde hybridisierte vermutlich mit den genomischen *URA3*-Regionen und ein Doppelsignal entstand, welches nicht von einer Mehrfachinsertion der Plasmide zu unterscheiden war. Das FRE-*YFP*-Reportergen verhielt sich bei der mikroskopischen Überprüfung nicht analog zum *CFP*-Reportergen (Abb. 2.27B), da seine Aktivierung unter Pheromon zu- statt abnahm, sodass die *YFP*-Reportergene für quantitative Messungen zunächst nicht weiter verwendet wurden.

2.3.2 Untersuchung der Signaltransduktionsdynamik des Fus3/Kss1-MAPK-Moduls unter vegetativen und unter Konjugationsbedingungen

2.3.2.1 Regulation von *Tec1*, *Ste12*, *Dig1* und *Dig2* und programmspezifischer Reportergene durch Pheromon

Nach Überprüfung der in Abschnitt 2.3.1.1 beschriebenen Hefestämme konnte nun das Verhalten von *Tec1*, *Ste12*, *Dig1* und *Dig2* quantitativ unter Konjugationsbedingungen untersucht werden. Der Versuchsablauf war ähnlich wie in 2.3.1.1 beschrieben, hier wurden die Zellen jedoch direkt nach der Übertragung in Glasboden-Kulturschälchen im Durchlicht (DIC) und in YFP- und CFP-Fluoreszenzlicht fotografiert (Zeitpunkt 0). Dann wurden je 2 μ M α -Faktor oder Methanol als Kontrolle zugegeben und die Zellen wurden für weitere zwei Stunden (90 min bei *Dig1* und *Dig2*) bei Raumtemperatur inkubiert und wieder fotografiert (Abb. 2.28). Für die im Zellkern lokalisierenden Regulatorproteine wurden Z-Bildstapel aufgenommen, wobei jeweils von der Fokusebene ausgehend in Bilder 0,5 μ m-Schritten gemacht wurden. Für die Quantifizierung der Bilder mit "ImageJ" wurde eine Maximalprojektion der Z-Stapel erstellt. Es wurden für Regulatoren und Reporter Durchschnittswerte aller Zellen in den Mikroskopiebildern bestimmt, theoretisch eignet sich die Quantifizierungsmethode jedoch auch für Einzelzellmessungen. Es wurde jeweils die Gesamtfluoreszenz der Hefezellen gemessen, diese beinhaltet Zellkern und Cytoplasma.

In Abb. 2.28A-C sind exemplarisch Fluoreszenzbilder von einigen Hefestämmen dargestellt, die *Tec1*-YFP oder *Ste12*-YFP und jeweils einen programmspezifischen CFP-Reporter tragen. Die Fluoreszenz von *Tec1*-YFP (Abb. 2.28A obere Reihe) nimmt unter Pheromon deutlich ab, man kann jedoch noch eine Rest-Fluoreszenz im Cytoplasma beobachten. Auch das Signal des 2 \times TCS-getriebenen CFP-Reporters wird

Cytoplasma beobachten. Auch das Signal des 2×TCS-getriebenen *CFP*-Reporters wird unter Pheromon schwächer (Abb. 2.28A mittlere Reihe). Zudem kann man im Durchlichtbild die Shmoobildung der Zellen mit Pheromon erkennen, was zeigt, dass die Zellen das Konjugationsprogramm ausführen (Abb. 2.28A untere Reihe).

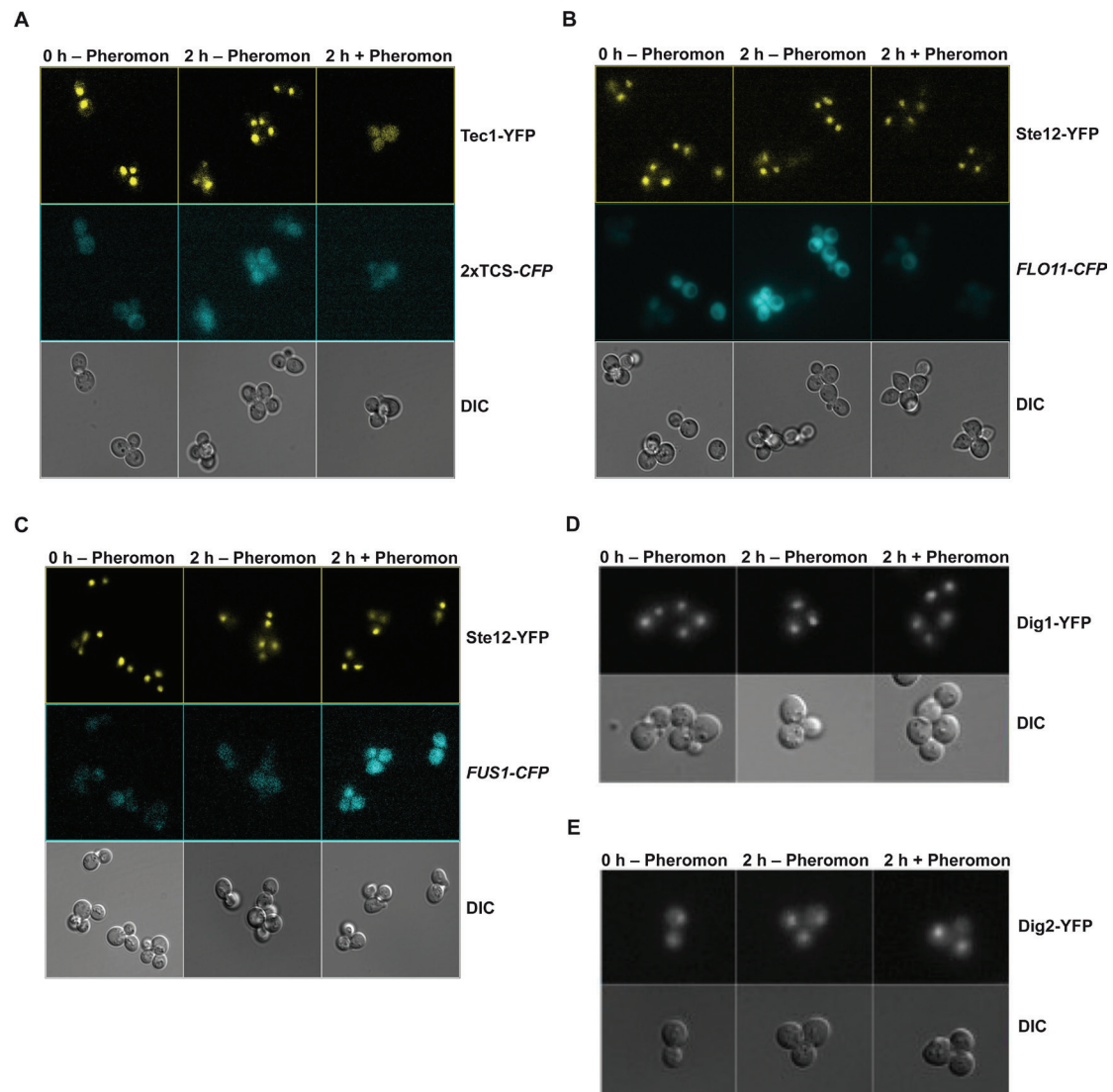


Abb. 2.28: Fluoreszenzmikroskopie von Tec1-YFP, Ste12-YFP, Dig1-YFP und Dig2-YFP und programm-spezifischer *CFP*-Reportergene unter vegetativen Bedingungen und Konjugationsbedingungen

Die folgenden Hefestämme wurden im Fluoreszenzmikroskop jeweils zum Zeitpunkt 0 h – Pheromon und nach 2 h – und + Pheromon im Durchlicht (DIC), YFP- und CFP-Kanal fotografiert, Bilder mit YFP-markierten Regulatoren sind Maximumprojektionen aus Z-Bildstapeln: **A)** YHUM1951 (*YFP-TEC1*, 2×TCS-*CFP*) **B)** YHUM1989 (*YFP-STE12*, *FLO11-CFP*) **C)** YHUM1916 (*YFP-STE12*, *FUS1-CFP*) **D)** YHUM1775 (*YFP-DIG1*) **E)** YHUM1776 (*YFP-DIG2*). D und E stammen aus Weissner, 2009.

Bei Ste12-YFP (Abb. 2.28BC jeweils obere Reihe) gibt es keinen sichtbaren Unterschied zwischen Zellen ohne Pheromon und Zellen mit Pheromon. Beim *FLO11-CFP*-Reporter (Abb. 2.28B mittlere Reihe) nimmt jedoch die Fluoreszenz unter Pheromoneinwirkung deutlich ab.

könnte (Halme *et al.*, 2004). Abb. 2.28C (mittlere Reihe) zeigt das Verhalten des konjugationsspezifischen *FUS1*-CFP-Reporters. Er weist ohne Pheromon eine geringe Fluoreszenz auf, unter Konjugationsbedingungen nimmt jedoch das CFP-Signal sehr stark zu, was eine starke Aktivierung der *FUS1*-Transkription repräsentiert. Bei Dig1-YFP und Dig2-YFP aus Weisser, 2009 (Abb. 2.28DE) sind keine signifikanten Unterschiede zwischen Zellen ohne Pheromon und Zellen mit Pheromon zu beobachten. Die Quantifizierungsdaten der Fluoreszenzmikroskopie sind in Abb. 2.29 dargestellt. Die Werte sind in "Arbitrary Units" angegeben, um eine bessere Vergleichbarkeit der Signalstärken zu ermöglichen.

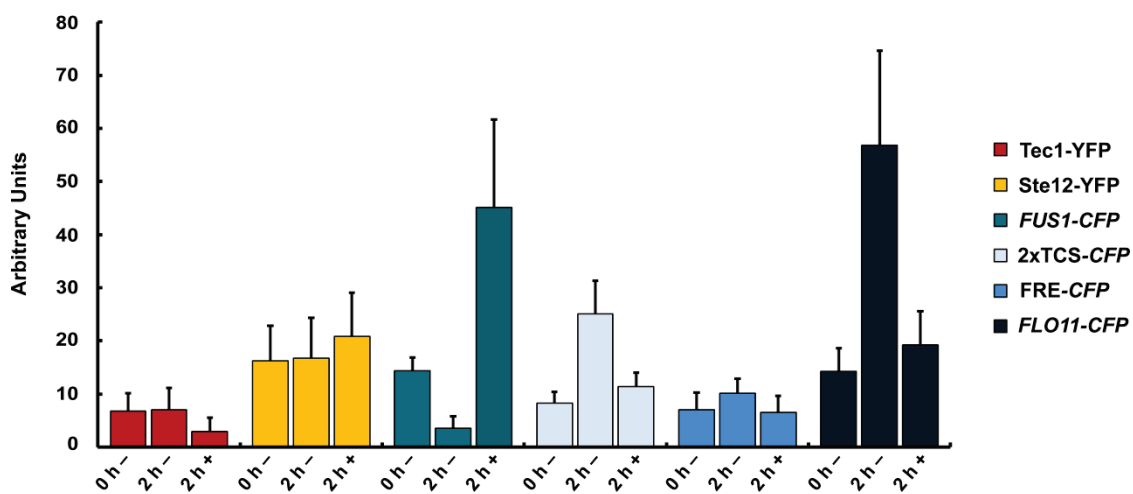


Abb. 2.29: Quantifizierung von Tec1-YFP, Ste12-YFP und programmspezifischer CFP-Reportergene unter vegetativen Bedingungen und Konjugationsbedingungen

Die Fluoreszenzsignale von Hefestämmen, die C-terminal YFP-markiertes Tec1, Ste12 und je ein chromosomal integriertes programmspezifisches CFP-Reportergen tragen, wurden quantifiziert. Für Details zum Versuchsaufbau siehe Text und Abb. 2.25. Die Werte sind Durchschnittswerte aus 3-9 unabhängigen Messungen jeweils zum Zeitpunkt 0 h –Pheromon und nach 2 h – und + Pheromon. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Fluoreszenzintensitäten von Tec1-YFP wurden bestimmt in YHUM1912, YHUM1950, YHUM1952 und YHUM1988. Fluoreszenzintensitäten von Ste12-YFP wurden bestimmt in YHUM1915, YHUM1916, YHUM1959 und YHUM1989. CFP-Fluoreszenzintensitäten wurden bestimmt in Hefestämmen, die die folgenden Reportergene tragen: 2xTCS-CFP (YHUM1950), FRE-CFP (YHUM1912, YHUM1915, YHUM1952), *FLO11*-CFP (YHUM1988, YHUM1989) und *FUS1*-CFP (YHUM1955, YHUM1957, YHUM1959).

Bei Tec1 ist nach 2 Stunden mit Pheromon eine deutliche Abnahme der Signalstärke von 7 auf 3 Einheiten zu beobachten, was einer Reduktion um etwa 60 % entspricht (Abb. 2.29). Bei Ste12 sieht man eine leichte Zunahme der Fluoreszenz und damit auch der Proteinmenge unter Pheromon von 17 auf 21 Einheiten, was einer Zunahme um rund 20 % entspricht. Auffällig ist die deutlich höhere Fluoreszenz von Ste12-YFP im Vergleich zu Tec1-YFP (etwa 2,3×). Diese könnte aus der höheren Anzahl an Ste12-Molekülen (1920 Moleküle) in der Zelle im Vergleich zur Anzahl an Tec1-Molekülen (530 Moleküle) resultieren (Ghaemmaghami *et al.*, 2003).

Die *CFP*-Reporter verhalten sich folgendermaßen: Die *FUSI-CFP*-Transkription fällt zunächst nach zwei Stunden Inkubation ohne Pheromon von 15 Einheiten auf 4 Einheiten ab. Bei Anwesenheit eines Pheromonsignals nimmt das CFP-Signal stark um das 12,5-fache zu. Bei *2×TCS-CFP* nimmt die Fluoreszenz nach zwei Stunden Inkubation ohne Pheromon deutlich von 8 auf 25 Einheiten zu, und fällt bei Pheromonzugabe wieder auf rund 45 % des Wertes bei 2 h – Pheromon ab. Dieser Wert korreliert sehr gut mit dem parallel stattfindenden pheromoninduzierten Abbau von *Tec1*. Die Aktivierung von *FRE-CFP* verläuft ähnlich und fällt bei 2 h + Pheromon auf rund 65 % des Wertes bei 2 h – Pheromon ab. Die Abnahme der Transkriptionsaktivierung des FREs unter Pheromon ist aber schwächer als die des *2×TCS*. Bei *FLO11-CFP* fällt auf, dass die Zellen eine vergleichsweise hohe Fluoreszenzintensität aufweisen (57 Einheiten). Die deutlich höhere Transkriptionsaktivierung resultiert vermutlich aus der Tatsache, dass *FLO11-CFP* einen vollständigen, stark regulierten Promotor enthält. Nach zwei Stunden mit Pheromon fällt die Aktivierung auf etwa 30 % des Wertes bei 2 h ohne Pheromon ab.

Generell fällt bei den biofilmspezifischen Reportergenen eine Zunahme der Fluoreszenz nach zwei Stunden Inkubation ohne Pheromon in den Kulturschälchen auf. Möglicherweise wird durch das Haften am Untergrund die biofilmspezifische Transkription weiter verstärkt. Eine Induktion durch Nährstoffmangel ist unter diesen Bedingungen auszuschließen. Da der Vergleich von Zellen nach zwei Stunden Inkubation aussagekräftiger ist, kann zukünftigen Arbeiten die Auswertung von Zeitpunkt 0 vernachlässigt werden.

2.3.2.2 Charakterisierung von *tec1Δ*-, *ste7Δ*- und *bar1Δ*-Stämmen unter vegetativen und unter Konjugationsbedingungen

Um das Messsystem zur quantitativen Analyse des Fus3/Kss1-MAPK-Moduls zu ergänzen, wurden verschiedene Deletionsstämme hergestellt, mit denen weitere Modulfunktionen überprüft werden können. Die Gendeletionen wurden ebenfalls mit der PCR-basierten Methode nach Janke *et al.*, 2004 durchgeführt, mittels PCR verifiziert und die Stämme durch Fluoreszenzmikroskopie charakterisiert.

Es wurde ein *tec1Δ*-Stamm hergestellt, bei dem die TCS-abhängige Transkriptionsaktivierung nicht mehr stattfinden kann. Die Transkriptionsaktivierung in einem *tec1Δ*-Stamm ist exemplarisch anhand des *FRE-CFP*-Reporters gezeigt

(Abb. 2.30A). Die Aktivierung des FREs im *tec1Δ*-Stamm ist wie erwartet im Vergleich zur Kontrolle fast völlig aufgehoben, und eine Pheromonabhängigkeit wurde dementsprechend nicht nachgewiesen.

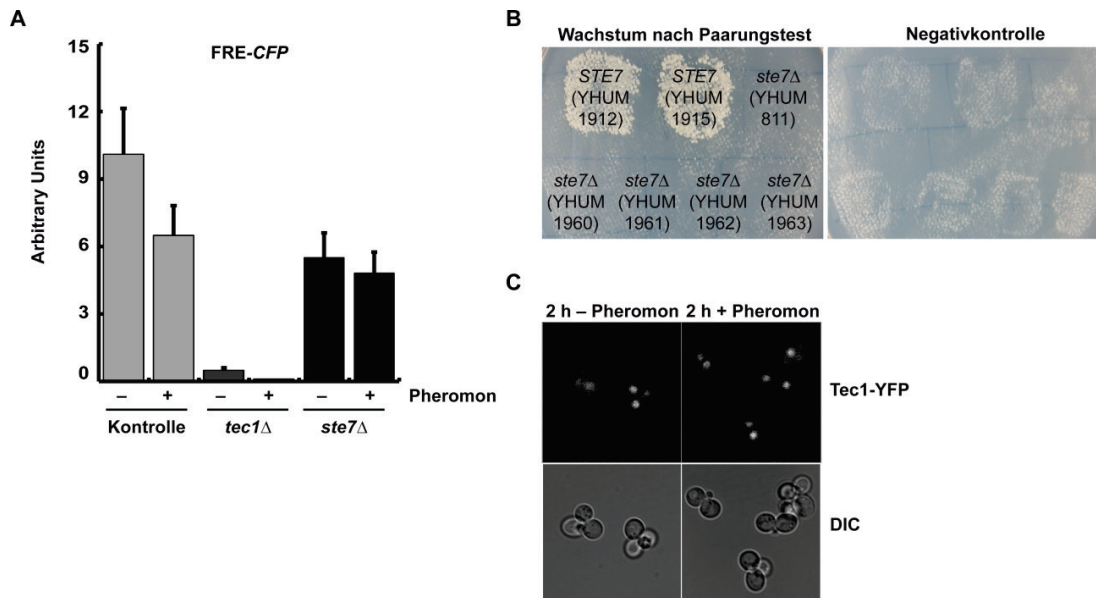


Abb. 2.30: Charakterisierung von *tec1Δ*- und *ste7Δ*-Stämmen

A) Aktivierung eines FRE-CFP-Reportergens in einem *tec1Δ*-Stamm (YHUM1964) und in einem *ste7Δ*-Stamm (YHUM1960) unter Konjugationsbedingungen. Als Kontrolle diente YHUM1912 (*TEC1*, *STE7*). Für Details zum Versuch siehe Abb. 2.25. **B)** Qualitativer Paarungstest mit den *ste7Δ*-Stämmen YHUM1960-YHUM1963. Als Positivkontrolle mit *STE7* dienten YHUM1912 und YHUM1915, als nicht paarungsfähige Kontrolle YHUM811 (*ste7Δ*). Diese *MATa*-Hefestämme wurden mit den Testerstämmen YHUM70 (*MATa*) oder YHUM69 (*MATa*, Negativkontrolle) gepaart. Die Selektion prototropher diploider *S. cerevisiae*-Zellen erfolgte auf YNB-Agarplatten. **C)** Fluoreszenzmikroskopie von YHUM1961 (*YFP-TEC1*, *ste7Δ*) nach 2 h mit und ohne Pheromon.

Des Weiteren wurden *ste7Δ*-Stämme hergestellt, bei denen Fus3 und Kss1 nicht mehr aktiviert werden können. Ste7 ist wichtig für eine effiziente *TEC1*-Transkription, vor allem unter Pheromoneinwirkung, und auch für den Fus3-vermittelten pheromon-induzierten Abbau von Tec1 (Brückner *et al.*, 2004). Die *ste7Δ*-Stämme wurden zunächst auf ihre Konjugationsfähigkeit überprüft, die erwartungsgemäß nicht feststellbar war (Abb. 2.30B). Die Aktivierung eines FREs im *ste7Δ*-Stamm ist im Vergleich zu einem Kontrollstamm fast um die Hälfte reduziert (Abb. 2.30A). Zudem ist die Pheromonabhängigkeit der FRE-Aktivierung aufgehoben. Mikroskopiebilder von Tec1-YFP (Abb. 2.30C) zeigen ebenfalls, dass in diesen Hefestämmen Tec1-YFP unter Pheromon nicht mehr abgebaut wird. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich die fehlende Fus3-vermittelte Destabilisierung von Tec1 im *ste7Δ*-Hintergrund.

Ein Westernblot gibt Aufschluss über die Tec1-Proteinmengen in *ste7Δ*- und *STE7*-Stämmen (Abb. 2.31A). Wie erwartet, ist in *ste7Δ*-Stämmen die Menge von nicht C-

terminal markiertem Tec1 im Vergleich zu *STE7*-Stämmen reduziert (Spuren 5-9). Ein Adhäsionstest auf Agar (Abb. 2.31B) zeigt ebenfalls, dass diese Stämme (YHUM1962 und YHUM1963), ein schlechteres Adhäsionsvermögen besitzen.

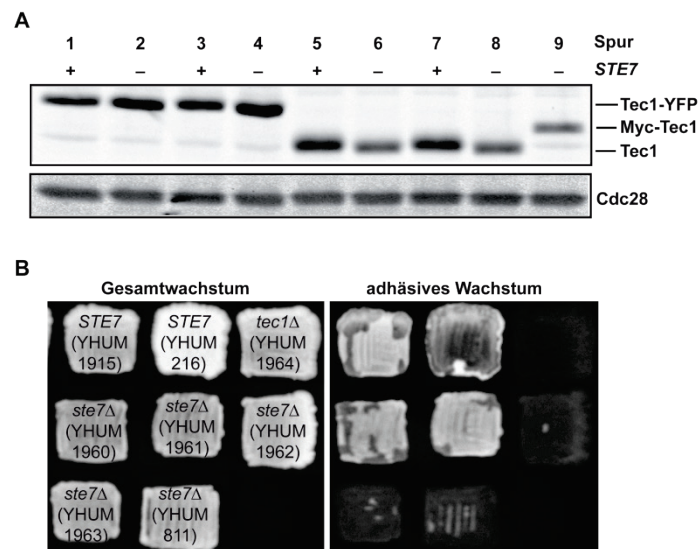


Abb. 2.31: Charakterisierung von *tec1Δ*- und *ste7Δ*-Stämmen

A) Immunoblot-Analyse zur Bestimmung der Tec1-Mengen in folgenden *STE7*- und *ste7Δ*-Stämmen: YHUM1912, YHUM1960, YHUM1913, YHUM1961 (*YFP-TEC1*, Spuren 1-4), YHUM1915, YHUM1962, YHUM1916, YHUM1963 (*TEC1*, Spuren 5-8) und YHUM811 (*TEC1-MYC*, Spur 9). **B)** Adhäsionstest auf Agar mit den *ste7Δ*-Stämmen YHUM1960-YHUM1963. Kontrollen für adhäsives Wachstum waren YHUM1915 und YHUM216, nicht-adhäsive Kontrollen waren YHUM1964 (*tec1Δ*) und YHUM811 (*ste7Δ*).

In Stämmen mit C-terminal YFP-markiertem ist allerdings keine Abnahme der Tec1-YFP-Menge im *ste7Δ*-Hintergrund zu beobachten (Abb. 2.31A). Auch im Waschtest zeigen diese Stämme eine vergleichsweise gute Adhäsion an Agar (Abb. 2.31B, YHUM1960 und YHUM1961). In einer nachfolgenden Arbeit (Fries, 2012) konnte jedoch gezeigt werden, dass die *TEC1*-Transkriptmengen in *ste7Δ*-Stämmen erwartungsgemäß deutlich reduziert waren, unabhängig von einer *YFP*-Markierung. Der Grund für die erhöhten Tec1-Proteinmengen in Stämmen mit *TEC1-YFP* liegt somit auf posttranskriptioneller Ebene. Das RNA-Bindeprotein Mpt5 kann durch seine Bindung an die 3'-UTR die Translation *TEC1*-mRNA inhibieren (Prinz *et al.*, 2007). Vermutlich ist durch die C-terminale YFP-Markierung die effiziente Bindung von Mpt5 an die *TEC1*-mRNA gestört. Somit kann die *TEC1-YFP*-mRNA viel besser translatiert werden, sodass im *ste7Δ*-Hintergrund ähnlich hohe Tec1-YFP-Mengen wie im *STE7*-Hintergrund zu beobachten sind.

Die Resultate zeigen jedoch insgesamt, dass die hergestellten Stämme funktionsfähig sind und für weiterführende Versuche verwendet werden können. Die konditionale

Steuerung von *STE7* mit Hilfe von regulierbaren Promotoren wie *CUP1(P)*, *MET25(P)*, *TET(P)* (Weisser, 2009; Fries, 2012) oder die kontrollierbare Degradierung des Ste7-Proteins (Weisser, 2011) war bisher jedoch nicht erfolgreich.

Des Weiteren wurde ein *bar1Δ*-Stamm hergestellt, der die Bar1-Protease nicht mehr synthetisieren kann, die für den Abbau des α -Faktors zur Rückkehr aus dem Pheromon-induzierten Zellzyklusarrest zuständig ist (Chan & Otte, 1982; Ballensiefen & Schmitt, 1997). Mit diesem Stamm sollte die Frage beantwortet werden, ob durch die erhöhte Pheromonempfindlichkeit die konjugationsspezifische Transkriptionsaktivierung verstärkt werden kann.

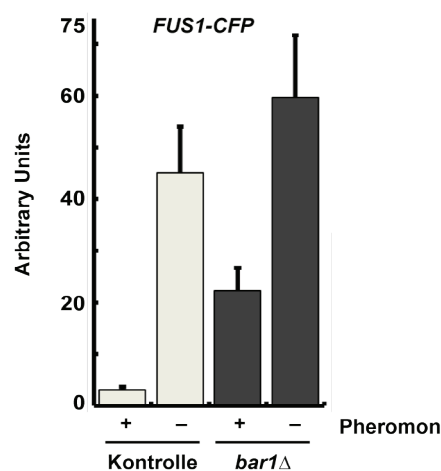


Abb. 2.32: Transkriptionsaktivierung von *FUS1-CFP* in einem *bar1Δ*-Stamm

Aktivierung eines *FUS1-CFP*-Reportergens in einem *bar1Δ*-Stamm (YHUM1966). Als Kontrolle diente YHUM1913 (*BARI*). Für Details zum Versuch siehe Abb. 2.25.

Der Effekt einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Pheromon im *bar1Δ*-Hintergrund auf die Induktion von *FUS1-CFP* ist bei der verwendeten Pheromonmenge von 1 μ M vernachlässigbar, da die Transkriptionsaktivierung im *bar1Δ*-Stamm nicht so stark ist wie in der Kontrolle (Abb. 2.32). Weitere *bar1Δ*-Stämme oder andere Pheromonkonzentrationen wurden zunächst nicht überprüft.

2.3.2.3 Untersuchung einer YFP-markierten, stabilen Tec1-Variante unter vegetativen und unter Konjugationsbedingungen

Mit dem *in-vivo*-Messsystem sollte außerdem untersucht werden, wie die Zielgenkontrolle einer Tec1-Variante aussieht, die nicht mehr unter Pheromon degradierbar ist. Es ist bekannt, dass eine Tec1-Variante, die eine T273M-Punktmutation trägt, welche das Cdc4-Phosphodegron zerstört, stabiler und nicht mehr

pheromonabhängig degradierbar ist (Bao *et al.*, 2004, Brückner *et al.*, 2004, Chou *et al.*, 2004). In einem Hefestamm, der bereits eine chromosomal integrierte $Tec1^{T273M}$ -Version trug, wurde $Tec1$ C-terminal mit YFP markiert, ebenso wie im dazugehörigen Kontrollstamm mit nativem $Tec1$. Das Verhalten von $Tec1^{T273M}$ -YFP und $Tec1$ -YFP unter Pheromon wurde zunächst qualitativ überprüft (Abb. 2.33).

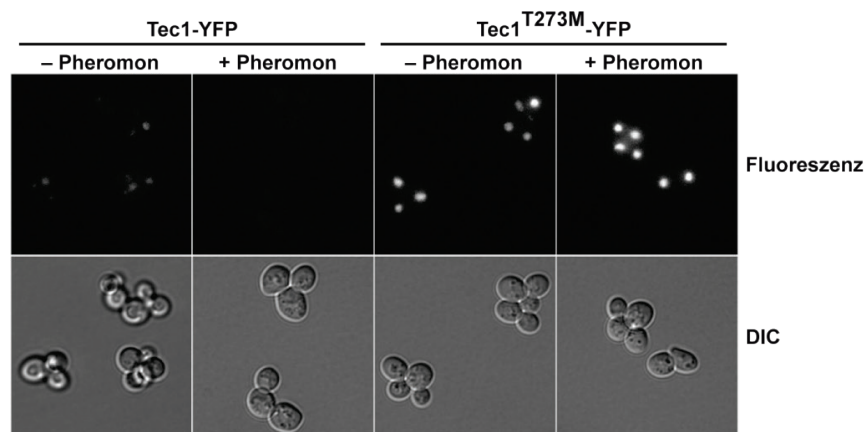


Abb. 2.33: Untersuchung einer YFP-markierten, stabilen $Tec1$ -Variante unter vegetativen Bedingungen und Konjugationsbedingungen

Fluoreszenzmikroskopie von $Tec1$ -YFP (YHUM2101) und $Tec1^{T273M}$ -YFP (YHUM2102) ohne (–) und mit (+) Pheromon im Durchlicht (DIC) und im YFP-Kanal. Für Details zum Versuchablauf siehe Abb. 2.25.

Das im Zellkern lokalisierende $Tec1$ -YFP wird wie erwartet unter Pheromon abgebaut. Das stabile $Tec1^{T273M}$ -YFP lokalisiert ebenfalls im Zellkern, zeigt jedoch erwartungsgemäß keine Abnahme der Fluoreszenz unter Pheromon. Außerdem ist die Signalintensität bei $Tec1^{T273M}$ -YFP stärker als die von $Tec1$ -YFP. Vermutlich ist die erhöhte Stabilität von $Tec1^{T273M}$ der Grund für die Zunahme der Proteinmenge im Vergleich zu $Tec1$. Die Hefestämme mit $Tec1^{T273M}$ -YFP und $Tec1$ -YFP sind funktionell, sodass sie in nachfolgenden Arbeiten für quantitative Messungen mit *CFP*-Reportergenen verwendet werden können.

Insgesamt zeigen die Daten dieses Kapitels, dass das System zur Untersuchung der Signaltransduktion im Fus3/Kss1-MAPK-Modul in lebenden Zellen verwendet werden kann. Die Transkriptionsfaktoren $Tec1$, $Ste12$, $Dig1$ und $Dig2$ sind nach der endogenen Markierung mit fluoreszenzierenden Proteinen funktionell und zeigen eine Dynamik unter vegetativen Bedingungen und unter Konjugationsbedingungen. Parallel kann man die Aktivität der Regulatoren mit programmspezifischen *CFP*-Reportergenen quantitativ bestimmen.

3 Diskussion

3.1 Kombinatorische und promotorspezifische Kontrolle von Tec1, Ste12, Msa1 und Msa2

In der vorliegenden Arbeit wurde am Beispiel des TEA-Transkriptionsfaktors Tec1 und Ste12 untersucht, welche Kombinationen von Transkriptionsfaktoren bei der Regulation von Wachstum und Differenzierung in Eukaryoten benötigt werden. Spezifisch sollte überprüft werden, wie Tec1 mit anderen Regulatoren interagiert, um programm- und promotorspezifische Zielgenkontrolle auszuüben. Die Komplexbildung von Tec1 mit anderen Regulatoren kann dessen Aktivität, Stabilität und seine Promotorbindung modifizieren. Im ersten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass Ste12 die Stabilität von Tec1 über dessen C-terminale Domäne regulieren kann. Tec1 kann die Aktivierung von Zielgenen jedoch auch Ste12-unabhängig über die C-terminale Domäne vermitteln. Tec1-Zielgene können in eine Ste12-abhängig und in Ste12-unabhängig regulierte Klasse eingeteilt werden. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die Co-Regulatoren Msa1 und Msa2 als neue Interaktionspartner von Tec1 identifiziert. Tec1, Msa1 und Msa2 regulieren gemeinsam zelluläre Differenzierungsprogramme wie Biofilmbildung und Konjugation, und wirken auf Prozesse wie Aminosäure- und Ribosomensynthese, die das Wachstum beeinflussen. Tec1, Ste12, Msa1 und Msa2 können untereinander verschiedene Komplexe ausbilden und binden in unterschiedlichen Kombinationen an die Promotoren ihrer Zielgene. Außerdem wurde ein Messsystem aufgebaut, mit dessen Hilfe man Menge, Lokalisierung und programmspezifische Aktivität der Regulatorproteine Tec1, Ste12, Dig1 und Dig2 quantitativ in lebenden Zellen bestimmen kann. Im Folgenden wird zunächst die Komplexbildung zwischen Tec1, Ste12, Msa1 und Msa2 mechanistisch erklärt. Weiterhin wird ein Modell vorgestellt, das die kombinatorische und promotorspezifische Kontrolle durch Tec1, Ste12, Msa1 und Msa2 bei der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse beschreibt. Schließlich wird die besondere Rolle von TEA-Transkriptionsfaktoren bei der Regulation von Wachstum und Differenzierung näher beleuchtet.

3.2 Tec1, Ste12, Msa1 und Msa2 können verschiedene Komplexe ausbilden

3.2.1 Die Komplexbildung zwischen Tec1 und Ste12

Die vorliegende Arbeit gibt Aufschluss über bisher unbekannte Funktionen der Tec1-Ste12-Komplexbildung *in vivo*. Ste12 kontrolliert die Stabilität von Tec1 über dessen C-terminale Domäne. Hierfür werden mindestens die Aminosäuren 377-486 von Tec1 benötigt (Abb. 3.1). Fusioniert man Tec1³⁷⁷⁻⁴⁸⁶ an den stabilen N-Terminus von Tec1 (Tec1¹⁻²⁸⁰), nimmt die Halbwertszeit dieses Fusionsproteins in Abwesenheit von Ste12 um das 5-fache ab. Die Halbwertszeit des vollständigen Tec1-Proteins im Vergleich zu Tec1¹⁻²⁸⁰ ist in Abwesenheit von Ste12 sogar um das 15-fache reduziert, weshalb der Schluss naheliegt, dass noch weitere Aminosäuren des Tec1-C-Terminus an dieser Stabilitätskontrolle beteiligt sind.

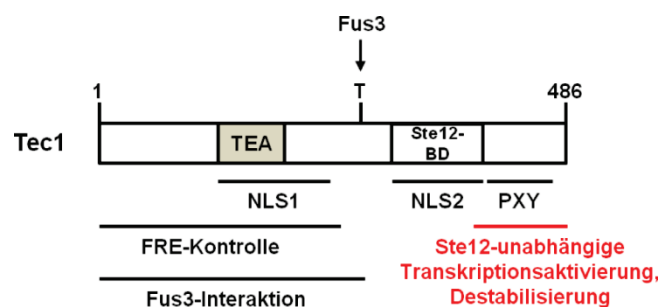


Abb. 3.1: Erweiterte Domänenstruktur von Tec1

Die bekannte Domänenstruktur von Tec1 kann durch den Bereich der Aminosäuren 377-486 erweitert werden, der nach den Ergebnissen dieser Arbeit eine Ste12-unabhängige Transkriptionsaktivierungsdomäne enthält. Gleichzeitig vermittelt dieser Bereich eine Destabilisierung von Tec1 in Abwesenheit von Ste12.

Die Stabilitätskontrolle eines Interaktionspartners durch einen anderen ist in *S. cerevisiae* bisher nur von den paarungstypspezifischen Proteinen MATa1 und MATa1 bekannt (Johnson *et al.*, 1998). Hier erhöht die Heterodimerbildung der beiden Proteine ihre Stabilität, da die Bindung des einen Interaktionspartners ein Ubiquitin-Degradierungssignal des anderen Partners maskiert. Die Ste12-Interaktionsdomäne von Tec1 (Aminosäuren 301-400) überlappt mit der minimalen Destabilisierungsdomäne (Aminosäuren 377-486). Es ist also denkbar, dass Ste12 auch ein Degradierungssignal von Tec1 maskiert.

Die Stabilitätskontrolle von Tec1 durch Ste12 funktioniert unabhängig vom Inhibitorprotein Dig1. Da Dig1 mit Tec1-Ste12-Komplexen assoziieren kann, wurde in Heise *et al.*, 2010 untersucht, ob die Tec1-Stabilität von auch Dig1 kontrolliert wird.

Dig1 hat im Ergebnis dieser Untersuchung jedoch keinen Einfluss auf die Halbwertszeit von Tec1, sowohl in An-, als auch in Abwesenheit von Ste12. Frühere Studien haben gezeigt, dass aufgrund der Phosphorylierung durch Fus3 an T273 von Tec1 unter Einwirkung von Pheromon dessen Stabilität herabgesetzt ist, und dass eine Mutation von Tec1 an T273 oder die Abwesenheit von Fus3 die Tec1-Stabilität erhöhen (Bao *et al.*, 2004; Brückner *et al.*, 2004; Chou *et al.*, 2004). Daraufhin wurde in Heise *et al.*, 2010 die Abbaurate von *URA3(P)-TEC1^{T273M}* in *STE12*- und *ste12Δ*-Stämmen bestimmt. Die Stabilität von Tec1^{T273M} mit und ohne Ste12 war vergleichbar mit der von Tec1. Das T273-Phosphodegron spielt also keine Rolle bei der Regulation der Tec1-Stabilität durch Ste12. Im C-Terminus von Tec1 befinden sich jedoch drei PxY-Motive, die am Rapamycin-induzierten Abbau von Tec1 durch die Ubiquitinligase Rsp5 beteiligt sind (Brückner *et al.*, 2011). Ob diese Motive und Rsp5 für die Ste12-assoziierte Stabilitätskontrolle von Tec1 verantwortlich sind, bleibt noch zu untersuchen.

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, enthält der C-Terminus von Tec1 eine Ste12-unabhängige Transkriptionsaktivierungsdomäne, die im Bereich der Aminosäuren 377-486 lokalisiert (Abb. 3.1). Fusioniert man Tec1³⁷⁷⁻⁴⁸⁶ an Tec1¹⁻²⁸⁰, erhöht dies die Transkriptionsaktivierung des Fusionsproteins um das 10-fache. Auch die Fusion von Tec1³⁷⁷⁻⁴⁸⁶ an die Ste12-DNA-Bindedomäne führt zu einer 4,2-fachen Zunahme der TCS-Reporterogenaktivierung. Vermutlich vermittelt die Ste12-unabhängige Aktivierungsdomäne ungefähr 50 % der gesamten Transkriptionsaktivierung durch Tec1, da die TCS-Aktivierung von Tec1¹⁻²⁸⁰-Tec1³⁷⁷⁻⁴⁸⁶ im Vergleich zu Tec1 um ungefähr die Hälfte reduziert war. Dies schließt jedoch nicht aus, dass noch weitere C-terminale Aminosäuren von Tec1 an der Ste12-unabhängigen Transkriptionsaktivierung beteiligt sind. Die Ste12-unabhängige Aktivierungsdomäne erschließt Tec1 weitere Möglichkeiten der Zielgenkontrolle, die bisher noch nicht untersucht wurden (Abb. 3.2).

Die Stabilitätskontrolle von Tec1 durch Ste12, zusätzlich zur Kontrolle der *TEC1*-Transkription durch Ste12, könnte der Zelle dabei helfen, akkurat zwischen den Ste12-abhängig regulierten Klasse-I- und den Ste12-unabhängig regulierten Klasse-II-Genen zu unterscheiden (siehe auch Abschnitt 3.3).

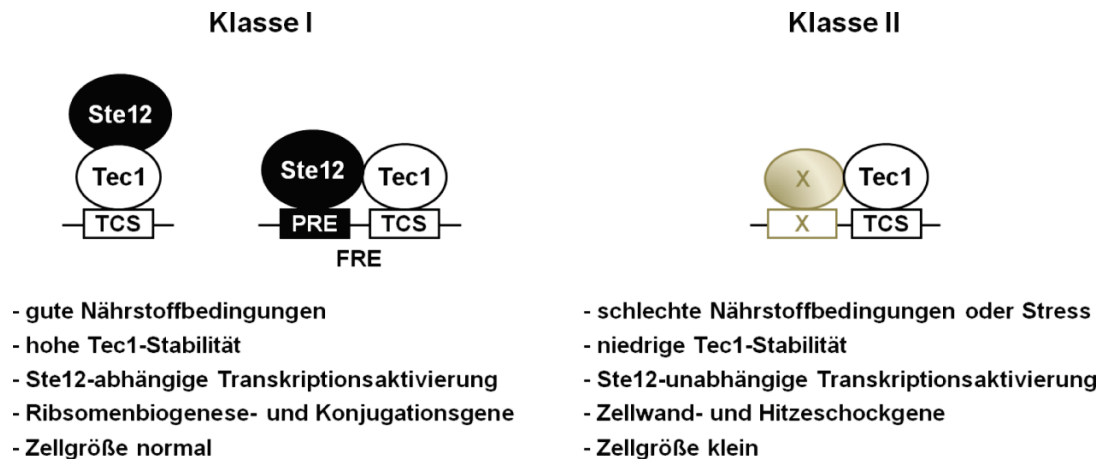


Abb. 3.2: Komplexe zwischen Tec1, Ste12 und weiteren Faktoren und ihre Funktionen

Klasse I: Mögliche Tec1-Ste12-Komplexe, die an TCS-Elemente und FREs binden können. Die Transkriptionsaktivierung dieser Komplexe, die in dieser Arbeit guten Nährstoffbedingungen untersucht wurde, wird vermutlich überwiegend durch Ste12 vermittelt. Klasse II: Möglicher Komplex zwischen Tec1 und einem noch nicht identifizierten Transkriptionsfaktor, der die Ste12-unabhängige Aktivierung der Genexpression vermittelt.

Unter welchen Bedingungen könnte dies eine Rolle spielen? Denkbar sind Schwankungen der Fus3/Kss1-MAPK-Modulaktivität zwischen einzelnen Zellen einer Population (Colman-Lerner *et al.*, 2005). Diese Schwankungen könnten zu Zell-zu-Zell-Variationen der Tec1-Mengen führen. Die erhöhte Tec1-Stabilität und die positive Rückkopplungsschleife bei der Kontrolle der *TEC1*-Transkription durch Ste12 könnten die effiziente Aktivierung von Klasse-I-Genen, z. B. von Ribosomenbiogenese-Genen, in Anwesenheit von Ste12 aufrechterhalten. Gleichzeitig wird durch die reduzierte Stabilität von Tec1 eine unerwünschte Aktivierung von Klasse-I-Genen durch Tec1 in Abwesenheit von Ste12, z. B. von Konjugationsgenen, verhindert. Aufschluss über die Richtigkeit dieser Hypothesen könnten Einzelzellanalysen geben, bei denen Tec1-Mengen, die Mengen anderer Regulatoren und die programmspezifische Transkription ermittelt werden, um die Stabilität der Signaltransduktion über einen Schwankungsbereich der MAPK-Modulaktivität zu bestimmen. Gleichzeitig ist die Ste12-unabhängige Transkriptionsaktivierungsdomäne von Tec1 wichtig für die Expression von Klasse-II-Genen unter besonderen Stress- oder Nährstoffbedingungen. Hierbei ist die Beteiligung weiterer Faktoren möglich, da Klasse-II-Gene für eine Bindung durch weitere Transkriptionsfaktoren wie Yap6, Nrg1, Cin5, Skn7, Hsf1 und Msn4 angereichert sind.

3.2.2 Die Komplexbildung zwischen Tec1, Ste12, Msa1 und Msa2

Ein zentrales Resultat dieser Arbeit ist, dass Tec1 effizient mit den Co-Aktivatoren Msa1 und Msa2 interagieren kann. Das Fehlen von *MSA1* führte zu einem Verlust der ohnehin schon etwas schwächeren Tec1-Msa2-Interaktion, umgekehrt führte das Fehlen von *MSA2* nicht zu einem Verlust der Tec1-Msa1-Interaktion. Ein neues Ergebnis ist außerdem, dass auch Ste12 mit Msa1 interagieren kann, nicht jedoch mit Msa2.

Das Fehlen von *TEC1* beeinträchtigt nicht die Interaktion von Ste12 mit Msa1. Ebenso ist die Interaktion von Tec1 mit Msa1 und Msa2 in Abwesenheit von *STE12* nicht gestört. Die Tec1-Msa1-Interaktion wird ohne Ste12 sogar ein wenig verstärkt, da der Anteil an "freiem" Tec1 zunimmt, wenn es nicht mehr in Ste12-Komplexen vorliegt. Das Fehlen von *MSA1* verringert zudem nicht die Effizienz der Tec1-Ste12-Interaktion. Tec1, Ste12, Msa1 und Msa2 können also untereinander verschiedene Komplexe ausbilden und bedingen nicht gegenseitig die Interaktion der anderen Partner (Abb. 3.3).

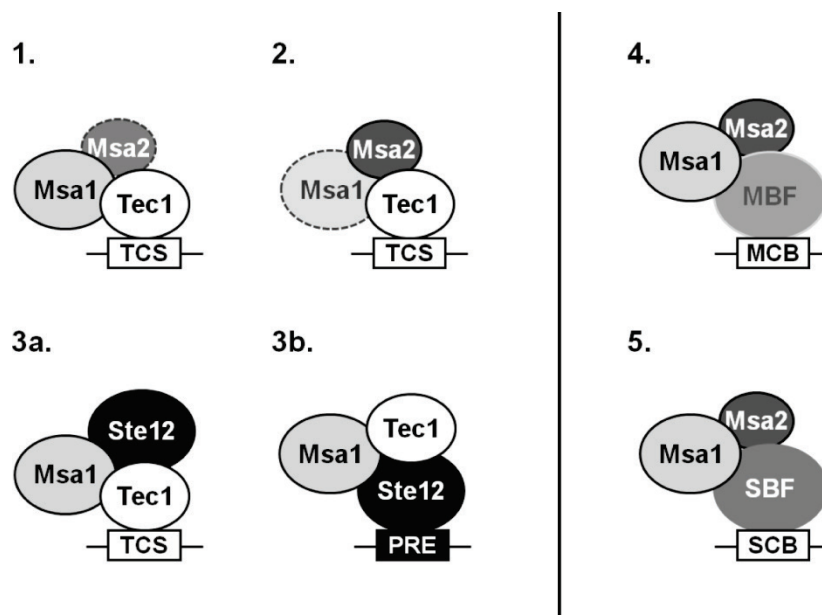


Abb. 3.3: Komplexe zwischen Tec1, Ste12, Msa1, Msa2, SBF und MBF

Folgende Komplexe konnten mittels Co-Immunopräzipitationen identifiziert werden: 1. Tec1-Msa1(-Msa2), 2. Tec1-Msa2(-Msa1), 3ab. Tec1-Ste12-Msa1, 4. MBF-Msa1-Msa2, 5. SBF-Msa1-Msa2. MBF steht für den Mbp1-Swi6-Komplex, SBF für den Swi4-Swi6-Komplex. Gezeigt sind außerdem mögliche DNA-Bindestellen der Komplexe.

Die DNA-Bindung dieser Komplexe kann nur über Tec1 und Ste12 erfolgen, da Msa1 und Msa2 keine eigenen DNA-Bindedomänen besitzen. 51 der 106 co-regulierten Zielgene von Tec1 und Msa1 (48 %) enthalten hochaffine TCS-Elemente in ihren Promotoren (Tab. A1 im Anhang). Gene, die von Tec1-Msa1-Komplexen gebunden werden, sind also wahrscheinlich über TCS-Elemente gesteuert. Ist zusätzlich Ste12 im

Tec1-Msa1-Komplex enthalten, kann dieser auch über PREs an die Promotoren von Zielgenen gelangen.

Msa1 und Msa2 beeinflussen die Stabilität von Tec1 nicht wie Ste12. Ob ihre Anwesenheit Auswirkungen auf die DNA-Bindefähigkeit von Tec1 und Ste12 hat, könnte *in vitro* mit Hilfe von Gelretardierungsexperimenten untersucht werden. Es ist jedoch auch möglich, dass ein weiteres, noch nicht identifiziertes Protein die Interaktion zwischen Tec1 und Msa1 oder Msa2 vermittelt. In diesen Zusammenhang wäre es interessant herauszufinden, ob Dig1 und Dig2 an der Komplexbildung beteiligt sind. Auch die Wachstumsbedingungen und der Zeitrahmen der Tec1-Msa1-Ste12- und der Tec1-Msa2-Interaktionen während des Zellzyklus, ist noch nicht genauer untersucht worden. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten stammen aus asynchronen Zellpopulationen unter guten Wachstumsbedingungen. Es ist ebenfalls unklar, welche Domänen von Tec1, Ste12, Msa1 und Msa2 für die Interaktion mit den anderen Faktoren notwendig sind. Bisher sind nur Bereiche von Tec1 und Ste12 für ihre Interaktion miteinander bekannt. Für die Beantwortung dieser Frage sind weitere Versuche mit Msa1-, Msa2-, Tec1- und Ste12-Proteinfragmenten nötig.

Die Komplexe zwischen Msa1, Msa2, Mbp1 und Swi4 sind getrennt von den oben beschriebenen Komplexen zwischen Tec1, Ste12, Msa1 und Msa2 zu betrachten (Abb. 3.3). Es war bereits bekannt, dass Msa1 und Msa2 mit Swi4 interagieren können, und dass Msa1 mit Mbp1 interagiert (Ashe *et al.*, 2008). Mbp1 und Swi4 bilden jeweils mit Swi6 die G1-spezifischen Transkriptionsfaktorkomplexe MBF und SBF (Andrews & Herskowitz, 1989; Koch *et al.*, 1993). Die Zielgenbindung durch diese Komplexe erfolgt über die DNA-Bindeproteine Mbp1 und Swi4, die mit MCB- bzw. SCB-Elementen interagieren (Abb. 3.3). Die Msa2-Swi6-Interaktion wurde in Krogan *et al.*, 2006 nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit neu identifiziert wurde jedoch der Msa2-Mbp1-Komplex. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Tec1 und Ste12 nicht Bestandteile dieser Komplexe sind. Msa1 ist sowohl an MBF-, als auch an SBF-kontrollierten Zielgenen zu finden, daher ist Msa1 möglicherweise immer mit MBF und SBF assoziiert (Ashe *et al.*, 2008). Für Msa2 wird das Gleiche postuliert, entsprechende Resultate werden aber in Ashe *et al.*, 2008 nicht gezeigt. Ob Msa1 und Msa2 gleichzeitig oder zeitlich versetzt an MBF und SBF binden, ist noch unklar.

3.3 Die Regulation transkriptioneller Programme zur Kontrolle von Wachstum und Differenzierung in *S. cerevisiae*

3.3.1 Die Regulation von Tec1-Zielgenen durch Ste12-abhängige Mechanismen

Viele Zielgene von Tec1 und Ste12 enthalten in ihren Promotorregionen TCS-Elemente ohne benachbarte PREs, werden aber durch Tec1, Ste12 und Dig1 gebunden (Zeitlinger *et al.*, 2003; Chou *et al.*, 2006; Heise *et al.*, 2010). Die Bindung von Tec1 an ein TCS-Element *in vitro* wird durch Ste12 nicht beeinflusst (van der Felden, 2008; Heise *et al.*, 2010). Außerdem gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen Tec1 und Tec1¹⁻²⁸⁰-Ste12-Hybriden bei der Regulation von TCS-Reportergen und vielen Klasse-I-Zielgenen. An Klasse-I-Gene wie *PGUI* (Biofilmbildung), *AGAI*, *PRM5* (Konjugation) und *SRDI* (rRNA-Synthese) kann Tec1 also vermutlich über einzelne TCS-Elemente mit Hilfe seiner TEA-Domäne binden, während Ste12 die Transkription über die beiden Aktivierungsdomänen ADI und ADII aktiviert. Die Stabilität von Tec1 ist in Anwesenheit von Ste12 hoch (Abb. 3.2).

Obwohl Tec1 ohne Ste12 effizient an das TCS-Element im FRE binden kann (van der Felden, 2008; Heise *et al.*, 2010), zeigen Daten, die in dieser Arbeit mit Hilfe eines FRE-*lacZ*-Reportergens ermittelt wurden, dass die relative Aktivierung des FREs mit 17 % in Abwesenheit von Ste12 im Vergleich zu der des TCS mit 124 % in Anwesenheit von Ste12 sehr gering ist. Bei FRE-regulierten Klasse-I-Genen spielt die kooperative Bindung des Tec1-Ste12-Komplexes folglich eine wichtige Rolle, wobei hier Ste12 den größeren Anteil der Transkriptionsaktivierung vermittelt (Abb. 3.2). FRE-kontrollierte Tec1-Ste12-Zielgene scheinen jedoch genomweit eher eine untergeordnete Rolle zu spielen, da bisher nur *Ty1* und *TEC1* als FRE-reguliert bezeichnet werden können (Laloux *et al.*, 1994; Baur *et al.*, 1997; Madhani & Fink, 1997). Das FRE im *FLO11*-Promotor scheint ein Sonderfall zu sein, da es in einer URS liegt und ein modifiziertes, nicht konserviertes PRE enthält. Bisher wurde außerdem noch keine gemeinsame Bindung durch Tec1 und Ste12 an *FLO11* nachgewiesen (Lo & Dranginis, 1998; Rupp *et al.*, 1999; Zeitlinger *et al.*, 2003; Chou *et al.*, 2006), hierzu siehe auch Abschnitt 3.3.3.

3.3.2 Die Regulation von Tec1-Zielgenen durch Ste12-unabhängige Mechanismen

Da Ste12 die Affinität von Tec1 zu dessen spezifischer Bindestelle auf der DNA nicht erhöht, wird es für die effiziente Tec1-TCS-Interaktion nicht benötigt. Zudem ist die Aktivierung der Transkription von Klasse-II-Genen abhängig von der C-terminalen Ste12-unabhängigen Aktivierungsdomäne von Tec1. Die bioinformatische Sequenzanalyse zeigte, dass 59 % der Klasse-II-Gene TCS-Elemente enthalten. So ist auch *FLO11* ein durch Tec1 Ste12-unabhängig regulierbares Gen, ebenso wie *DDR48* (DNA-Schädigung) *HXK1* (Glucose-Metabolismus) und *YLR042C* (unbekannte Funktion).

Nur wenige Klasse-II-Gene werden jedoch durch Tec1 unter nährstoffreichen Bedingungen gebunden (Harbison *et al.*, 2004). Eine Bindung durch Tec1 an TCS-Elemente in Promotoren dieser Gene findet jedoch vermutlich nur unter besonderen Bedingungen statt, da Klasse-II-Gene, die überwiegend für Zellwand-assoziierte Proteine oder Hitzeschock-Proteine codieren, für eine Bindung durch die Transkriptionsfaktoren Yap6, Nrg1, Cin5, Skn7, Hsf1 und Msn4 unter hyperoxischem Stress angereichert sind (Abb. 3.2). Bisher gibt es noch keine Untersuchungen der genomweiten Promotorbindung durch Tec1 unter verschiedenen Stressbedingungen. Es ist daher nicht ausgeschlossen, dass die Bindung von Tec1 an Klasse-II-Promotoren durch seine Assoziation mit anderen Faktoren verstärkt wird. Yap6, Cin5, Skn7 werden bei oxidativem Stress und hohem Salzgehalt benötigt, Hsf1 und Msn4 bei einem Hitzeschock und Nrg1 bei Glucosemangel (Martínez-Pastor *et al.*, 1996; Mendizabal *et al.*, 1998; Kuchin *et al.*, 2002; Hahn *et al.*, 2004; Sollner *et al.*, 2009). Bei osmotischem Stress nimmt die Menge von sumoyliertem Tec1 ab, was seine Fähigkeit zur Transkriptionsaktivierung steigert (Wang *et al.*, 2009). Dies spricht auch dafür, dass Tec1 eine Rolle bei der stressinduzierten Transkriptionsregulation spielt. Es wäre interessant herauszufinden, ob Tec1 mit den genannten Transkriptionsfaktoren unter den verschiedenen Stressbedingungen interagiert oder gemeinsam mit ihnen an Promotoren von Tec1-Zielgenen zu finden ist.

Möglich ist jedoch auch, dass Tec1 Klasse-II-Gene indirekt reguliert, beispielsweise über Transkriptionsfaktoren, deren Gene unter Kontrolle von Tec1 stehen. Der Promotor von *RP11* beispielsweise enthält mindestens ein TCS-Element und wird von Tec1 unter nährstoffreichen Bedingungen gebunden (Harbison *et al.*, 2004). Rpi1 wird beim Hitzeschock und in der Stationärphase benötigt (Kim & Powers, 1991; Sobering *et al.*, 2002).

Die in dieser Arbeit aufgestellte Hypothese, dass Tec1 bei der Regulation von Stress-assoziierten Genen eine wichtige Rolle spielt, wird unterstützt durch das Resultat, dass Tec1 die Zellgröße positiv beeinflussen kann. Stress kann durch die Reduktion der Wachstumsrate und der Ribosomenbiogenese zu kleineren Zellen führen (Marion *et al.*, 2004; Cook & Tyers, 2007; Turner *et al.*, 2012). 607 von 647 der in Kapitel 2.2 ermittelten Zielgene von Tec1, also 94 %, sind negativ durch diesen Faktor reguliert. Möglich ist, dass Tec1 die Expression von Stressgenen reprimiert, solange keine Stressbedingungen vorliegen. Bei der Ste12-unabhängigen Transkriptionskontrolle durch Tec1 ist dessen Stabilität herabgesetzt. Starker Nährstoffmangel oder Rapamycin können auch zu einer Abnahme der Tec1-Stabilität führen (Brückner, 2007; Brückner *et al.*, 2011). Daher ist es denkbar, dass der Abbau von Tec1 die Aktivierung der Transkription von Stressgenen direkt oder indirekt induziert. Ob diese Mechanismen auch für TEA-Proteine aus anderen Organismen gültig sind, muss noch untersucht werden.

3.3.3 Die Regulation der Biofilmbildung durch Tec1, Ste12, Msa1 und Msa2

Die Regulation der Biofilmbildung durch die Transkriptionsfaktoren Tec1 und Ste12 wurde in dieser Arbeit einerseits quantitativ mit dem *in-vivo*-System zur Untersuchung der Fus3/Kss1-MAPK-Modulaktivität charakterisiert, andererseits konnten neue Mechanismen identifiziert werden, wie die Differenzierungsprogramme Biofilmbildung und Konjugation durch Tec1, Ste12, Msa1 und Msa2 reguliert werden können.

Bei guter Nährstoffversorgung unter vegetativen Wachstumsbedingungen war keine Veränderung der Tec1- und Ste12-YFP-Mengen und der FRE-*CFP*-Aktivierung zu beobachten. Beim TCS- und beim *FLO11-CFP*-Reporter erfolgte eine Zunahme der Transkriptionsaktivierung um das 3- bzw. 4-fache. Dieser Anstieg korreliert nicht mit der Tec1-YFP-Menge. Vorstellbar ist, dass die biofilmspezifische Transkription durch den Kontakt zu einer abiotischen Oberfläche wie den Glasboden der Mikroskopieschälchen oder durch den Kontakt zum Lektin Concanavalin-A, das z. B. Mannose auf der Oberfläche der Hefezellen bindet, weiter verstärkt wird.

Das Verhalten des Fus3/Kss1-MAPK-Moduls bei Abwesenheit von Glucose und gleichzeitiger Anwesenheit einer anderen C-Quelle wurde in einer von der Autorin betreuten Masterarbeit untersucht (Weisser, 2011). Es wurden die Effekte der fermentierbaren C-Quelle Galaktose, welche oft für die Regulation von induzierbaren

Fusionsgenen benutzt wird, und die der nicht-fermentierbaren C-Quellen Ethanol und Butanol auf Menge und Lokalisierung der Regulatoren Tec1, Ste12, Dig1 und Dig2 überprüft. Ethanol und Butanol induzieren filamentöses Wachstum in diploiden Hefestämmen (Lorenz *et al.*, 2000). In Weisser, 2011 wurden haploide *S. cerevisiae*-Zellen in LFM mit Galaktose, Ethanol oder Butanol für 6 Stunden inkubiert und die erhaltenen Daten wurden dann mit denen einer 6-stündigen Inkubation mit Glucose verglichen. Die Tec1-YFP-Menge nahm mit Galaktose im Vergleich zu Glucose um etwa 50 % ab. Bei den anderen Regulatoren nahmen die Proteinmengen um rund 25-45 % ab, während mit Ethanol keine signifikanten Veränderungen zu beobachten waren. Bei Butanol trat eine starke Reduktion der Kernlokalisation von Tec1, Ste12, Dig1 und Dig2 auf. Die Fluoreszenz von Ste12-, Dig1- und Dig2-YFP nahm jeweils um 60-80 % ab. Bei Tec1 fand jedoch bei Inkubation mit Butanol keine starke Änderung der Proteinmenge statt.

Diese Daten lassen darauf schließen, dass die Abnahme der Tec1-Menge bei Galaktose dazu führt, dass die Biofilmbildung nicht mehr effizient aktiviert werden kann. Bei einem Waschest auf Galaktose-haltigem Agar konnten die Hefestämme auch nicht mehr adhäsiv wachsen (Weisser, 2011). Der Grund für die Abnahme der Tec1-Menge könnte die Regulation von Tec1 durch den TOR1-Signalweg sein. Die Inhibierung von TORC1 bei Nährstoffmangel, Stress oder Rapamycin führt zu einer Reduktion des Zellwachstums (Loewith *et al.*, 2002). Unter Rapamycin wurde die Reduktion der Proteinmenge auf 20 % des Ausgangswertes festgestellt (Brückner *et al.*, 2011). Der Einfluss von Rapamycin auf Tec1-YFP wurde auch bereits mit dem *in-vivo*-Messsystem untersucht (Weisser, 2009 und Weisser, unveröffentlichte Resultate). Die Tec1-YFP-Menge nahm nach 75-minütiger Inkubation mit Rapamycin um etwa 50 % ab.

Es gibt außerdem neue Erkenntnisse zur promotor-spezifischen Kontrolle der *FLO11*-Expression unter guten Nährstoffbedingungen. Die genomweiten Transkriptanalysen in Kapitel 2.1 ergaben, dass Tec1 *FLO11* Ste12-unabhängig regulieren kann (siehe auch Abschnitt 3.2.2). Ein überraschendes Resultat ist, dass Msa1 und Msa2 für die effiziente Aktivierung der Transkription eines *FLO11*-CFP-Reportergens benötigt werden. Entsprechend war die Biofilmbildung auf Agar und Plastik verringert, wenn mindestens Msa1 fehlt. Bei der Adhäsion an Plastik und Agar hatte das Fehlen von *MSA2* allein nahezu keinen Effekt. *MSA1* und *MSA2* scheinen jedoch generell bei der *FLO11*-Regulation additiv zu wirken.

Fusioniert man Msa1 oder Msa2 mit der DNA-Bindedomäne von Tec1, zeigen sich bei den *CFP*-Reportergenens promotorspezifische Unterschiede bei der Transkriptionsaktivierung durch Msa1 und Msa2. Die Fusion mit Msa2 hatte entgegen der Analysen mit den *msa1Δ*- und *msa2Δ*-Stämmen einen stärkeren positiven Effekt auf die *FLO11*-*CFP*-Expression. Dementgegen hatte die Fusion mit Msa1 am 2×TCS einen stärkeren positiven Effekt. Insgesamt decken sich die hier gewonnenen Daten mit den Resultaten von Titz *et al.*, 2006, die Msa1 und Msa2 als starke Transkriptionsaktivatoren identifizieren. Am *FLO11*-Promotor konnte in den ChIP-Analysen nur die Bindung von Msa1, nicht aber die von Ste12 oder Msa2 nachgewiesen werden (Abb. 3.4).

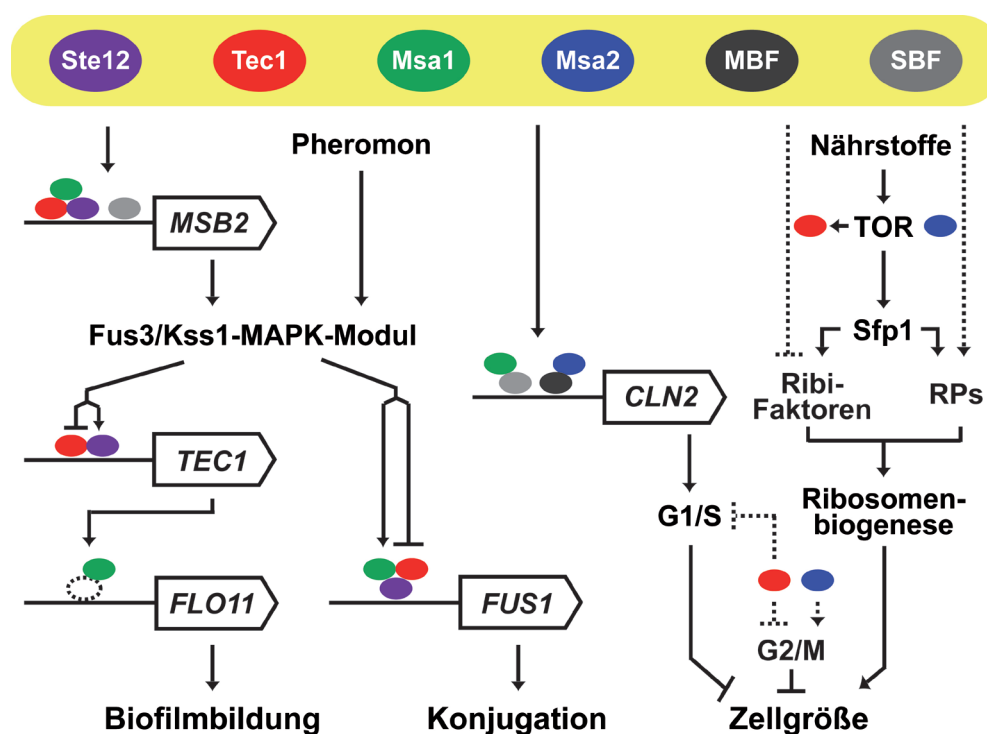


Abb. 3.4: Mechanismen der Zielgenkontrolle durch Tec1, Ste12, Msa1, Msa2, MBF und SBF

Identifizierte Proteinkomplexe und die durch sie regulierten Promotoren und Prozesse. Durchgehende Pfeile bzw. Balken stehen für positive bzw. negative Regulation, gestrichelte Pfeile und Balken stehen für eine mutmaßliche Regulation. Für Details siehe Text.

Die Bindung von Msa1 an *FLO11* ist abhängig von Tec1, da das Fehlen von *TEC1* die Bindungseffizienz von Msa1 an *FLO11* verringert. Unklar ist, wie Msa1 an die DNA rekrutiert wird, denn auch die anderen Msa1-Interaktoren Mbp1 und Swi4 konnten nicht am *FLO11*-Promotor nachgewiesen werden. MBF- oder SBF-Bindestellen sind für *FLO11* nicht bekannt (Harbison *et al.*, 2004).

Eine Möglichkeit, wie Msa1 an *FLO11* gelangen könnte, wäre über den in Abschnitt 3.3.2 erwähnten Transkriptionsregulator Rpi1, der die Fähigkeit zur DNA-Bindung

besitzt (www.uniprot.org; Sobering *et al.*, 2002). *RPII* ist ein Ste12-unabhängig Tec1-reguliertes Gen, womit die Tec1-Abhängigkeit der Msa1-*FLO11*-Interaktion erklärt werden könnte, falls Msa1 wirklich über Rpi1 an *FLO11* gelangt. Msa2 reguliert *RPII* ebenfalls. Nicht auszuschließen ist, dass Tec1, Ste12, Msa1 und Msa2 den 3 kb langen *FLO11*-Promotor an einer anderen Stelle als der in den ChIP-Analysen untersuchten binden (Abb. 2.18, Nukleotid –198 bis –503). So liegt beispielsweise das mutmaßliche FRE bei Nukleotid –699 bis –725. Ein weiteres, hochaffines TCS-Element beginnt bei Nukleotid –871 (Tab. A1 im Anhang).

Die Daten, die mit einem TCS-*lacZ*-Reportergen in Abwesenheit von *MSA1* und/oder *MSA2* gewonnen wurden, lassen darauf schließen, dass Msa1 und Msa2 die Tec1-vermittelte Genexpression direkt am Promotor beeinflussen, da ihre Abwesenheit die TCS-Aktivierung verringert. Msa1 hat bei der TCS-Aktivierung, wie bei *FLO11*, einen stärkeren Effekt als Msa2. Msa1 und Msa2 haben eine additive Wirkung auf die TCS-Aktivierung. Allerdings ist dieser Effekt nur zu beobachten, wenn Ste12 vorhanden ist und *TEC1* von seinem natürlichen Promotor aus exprimiert wird. Wird *TEC1* zellzyklusunabhängig vom *URA3*-Promotor getrieben, ist die Auswirkung einer Deletion der *MSA*-Gene nur noch gering. Eine *TEC1*-Überexpression konnte das Fehlen von *MSA1* und *MSA2* bei der Adhäsion an Plastik und an Agar supprimieren. Vermutlich sind also der richtige Zeitpunkt der Tec1-Msa-Interaktion während des Zellzyklus, oder die Tec1-Menge zu diesem Zeitpunkt, wichtig für eine effiziente TCS-Aktivierung. Dass sich die TCS-Aktivierung nicht erheblich anders verhält, wenn gleichzeitig Ste12 fehlt, könnte darauf zurückzuführen sein, dass Ste12 keinen Einfluss auf die TCS-Aktivierung durch Tec1-Msa1-Komplexe hat. Das Biofilm-assoziierte Tec1-Zielgen *PGUI* hingegen wird der Klasse der Ste12-abhängig regulierten Gene zugeordnet.

Ein weiteres Resultat dieser Arbeit ist, dass Tec1 auch die Expression *MSB2* regulieren kann. *MSB2* codiert das für das signaldetektierende Mucin Msb2, das am Anfang des nährstoffkontrollierten Fus3/Kss1-MAPK-Weges steht (Cullen *et al.*, 2004). Eine Bindung des *MSB2*-Promotors durch Tec1 unter guten Wachstumsbedingungen und durch Tec1 und Ste12 unter Butanol wurde bereits nachgewiesen (Zeitlinger *et al.*, 2003; Harbison *et al.*, 2004). In dieser Arbeit konnte dieses Ergebnis bei guten Nährstoffbedingungen verifiziert werden, da Tec1 und Ste12 in der ChIP-Analyse am *MSB2*-Promotor nachgewiesen wurden (Abb. 3.4). Bisher gab es aber noch keine Daten

zur Regulation von *MSB2* durch Tec1. Bemerkenswert ist, dass die Expression von *MSB2* in der *msa1Δ msa2Δ*-Doppelmutante reduziert ist und dass Msa1 am *MSB2*-Promotor bindet. Es konnten 4 hochaffine Tec1-Bindestellen identifiziert werden, von denen 3 in dem Bereich lagen, der in den ChIP-Analysen untersucht wurde. Außerdem liegt in diesem Bereich ein PRE. Es ist also wahrscheinlich, dass der Tec1-Ste12-Msa1-Komplex entweder an TCS-Elemente oder ein PRE bindet. Die positive Regulation von *MSB2* durch Tec1, das am Ende des Fus3/Kss1-MAPK-Weges steht, bildet eine bisher unbekannte positive Rückkopplungsschleife in diesem Signalweg.

Die ChIP-Analysen ergaben außerdem, dass *MSB2* durch Swi4 gebunden wird. Bisher war nur bekannt, dass *MSB2* auch ein zellzyklusreguliertes Gen ist, dessen maximale Expression in der G1-Phase liegt, und dass es eine potentielle SBF-Bindestelle besitzt (Spellman *et al.*, 1998). Darüber hinaus ist Msa1 ein mögliches Substrat von Cdc28 (Übersax *et al.*, 2003). Es besteht die Möglichkeit, dass Msa1 auch über SBF an *MSB2* gelangt. Damit deutet vieles darauf hin, dass am *MSB2*-Promotor Nährstoff- und Zellzyklussignale über Tec1 und Swi4 integriert werden.

3.3.4 Die Regulation der Konjugation durch Tec1, Ste12, Msa1 und Msa2

Die transkriptionelle Regulation des Konjugationsprogramms erfolgt vor allem über PREs durch Ste12 (Hagen *et al.*, 1991; Yuan & Fields, 1991; Yuan *et al.*, 1993). Tec1 wird bei einem Pheromonsignal abgebaut (Bao *et al.*, 2004; Brückner *et al.*, 2004; Chou *et al.*, 2004). Um das während dieser Arbeit aufgebaute *in-vivo*-System zur Untersuchung der Fus3/Kss1-MAPK-Modulaktivität zu validieren, wurde das Umschalten vom vegetativen Wachstum zur Konjugation anhand des Verhaltens der Regulatoren Tec1 und Ste12 und der TCS-, FRE-, *FLO11(P)*- und *FUS1(P)*-gesteuerten programmspezifischen *CFP*-Reportergene untersucht. Die Tec1-YFP-Menge nahm nach 2-stündiger Inkubation mit Pheromon um etwa 60 % ab. Dieser Wert korreliert sehr gut mit Daten aus Brückner *et al.*, 2004, Weisser, 2009 und Weisser, 2011. Die Ste12-YFP-Menge nahm unter Pheromon leicht um rund 20 % zu. Eine Zunahme der *STE12*-mRNA-Menge unter Pheromon ist bereits gezeigt worden (Roberts *et al.*, 2000). Obwohl die Aktivierung von Ste12 vor allem durch die Phosphorylierung durch Fus3 und Kss1 und durch die Freisetzung der Inhibitoren Dig1 und Dig2 erfolgt (Hung *et al.*, 1997; Olson *et al.*, 2000), nimmt Ste12-Proteinmenge unter Pheromon noch leicht zu. Entsprechend stieg die *FUS1-CFP*-Transkription mit Pheromon um das 12,5-fache

an. In einer früheren Studie wurde eine 40-fache Induktion der *FUS1*-CFP-Transkription nachgewiesen, jedoch lag der Messzeitpunkt bereits 40 min nach Pheromonzugabe. Nach 2 Stunden mit Pheromon war in dieser Studie bereits ein starker Rückgang der *FUS1*-CFP-Transkription zu beobachten (Hackett *et al.*, 2006). Die Bestimmung der Reaktionskinetiken des Fus3/Kss1-MAPK-Moduls mit dem hier aufgebauten Messsystem kann Aufschluss über den idealen Messzeitpunkt geben.

Korrelierend mit dem Rückgang der Tec1-Menge unter Pheromon nahm die *FLO11*-CFP-Expression deutlich ab und fiel auf 30 % des Ausgangswertes. Dieses Ergebnis spiegelt ein Resultat aus einer vorhergehenden Studie wider, in der ebenfalls eine deutliche Reduktion der *FLO11*-Transkriptmenge um das 14-fache festgestellt wurde (Brückner *et al.*, 2004). Die TCS-Expression verhielt sich ähnlich und fiel auf 45 % des Ausgangswertes. Beim FRE war ebenfalls eine Reduktion detektierbar, die aber deutlich schwächer als die des 2×TCS oder die von *FLO11* mit Pheromon war. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass Ste12 einen Teil des nicht-degradierten Tec1 zum TCS im FRE rekrutiert und so das Tec1-Ste12-Heterodimer trotz Pheromoneinwirkung noch eine effiziente Transkriptionsaktivierung am FRE ausüben kann.

Die vorliegende Arbeit gibt auch neue Einblicke in die Mechanismen der Regulation der Konjugation durch Tec1, Ste12, Msa1 und Msa2. Ein Großteil der Klasse-I-Gene sind Konjugationsgene wie *AGA1* und *PRM5*, die durch Tec1 negativ reguliert werden. Die pheromonabhängige ADII von Ste12 kann mit Dig1 interagieren (Olson *et al.*, 2000). Es ist also vorstellbar, dass Klasse I-Gene auch durch Dig1 reguliert werden. Interessanterweise werden *FUS1*, *AGA1* und *PRM5* von Tec1, Msa1 und/oder Msa2 gemeinsam reguliert (Tab. A1 im Anhang). Während Msa1 und Tec1 viele Konjugationsgene negativ regulieren (Abb. 3.4), hat Msa2 auf die Expression von *FUS1* und *AGA1* einen positiven Einfluss.

Es besteht aktuell die Vorstellung, dass die Tec1-Ste12-Komplexbildung die fälschliche Aktivierung von Konjugationsgenen reprimiert. Die Anwesenheit von Tec1 hemmt zwar die effiziente Aktivierung von Paarungsgenen, bindet aber auch an diese (Oehlen & Cross, 1998; Zeitlinger *et al.*, 2003; Brückner *et al.*, 2004; Chou *et al.*, 2006; Chou *et al.*, 2008). Auch Msa1 konnte in dieser Arbeit am *FUS1*-Promotor nachgewiesen werden und bindet auf Tec1-abhängige Art an *FUS1*. Da der *FUS1*-Promotor 4 PREs und nur ein nicht-hochaffines TCS enthält, rekrutiert vermutlich Ste12 Tec1 und Msa1 an die DNA. Das Vorhandensein eines geringen Anteils von Ste12-Tec1-Msa1 und

eventuell Dig1 an Konjugationsgenen, anstelle von Ste12-Dig1-Dig2, könnte der *S. cerevisiae*-Zelle eine zusätzliche Möglichkeit zur negativen Regulation bieten. Promotorspezifische Interaktionen zwischen Tec1, Ste12, Msa1 sind also wichtig für die korrekte und effiziente Ausführung der Transkriptionsprogramme Biofilmbildung und Konjugation.

3.3.5 Die Regulation der Zellgröße

3.3.5.1 Die Regulation der Zellgröße durch Tec1

Die Transkriptomanalysen in Kapitel 2.2 mit einem *tec1Δ*-Stamm haben ergeben, dass 94 % der Tec1-Zielgene negativ durch Tec1 reguliert werden. Es ist daher wahrscheinlich, dass Tec1 die Zellgröße reguliert, indem es die Expression von Genen reprimiert, die die Zellgröße beeinflussen. Es konnten 23 Gene identifiziert werden, die durch Tec1 negativ reguliert werden und deren Deletion tatsächlich eine Vergrößerung der Zellen verursacht (Tab. 3.1).

Einige dieser Gene beeinflussen die G1/S-Transition im Zellzyklus. So auch *RSC1*, das für eine Komponente des RSC-Chromatin-"Remodeling"-Komplexes codiert, der generell für Transkriptionsvorgänge in der Zelle benötigt wird (Cairns *et al.*, 1996). Weitere Beispiele sind *BUR2*, das für ein Cyklin des Sgv1/Bur1 CDK-Komplex codiert, der ebenfalls für die transkriptionelle Regulation benötigt wird (Yao *et al.*, 2000), und *MCM7*, codierend für einen Bestandteil des MCM2-7-Komplexes, der Replikationsursprünge in der G1-Phase besetzt (Tye, 1999). Weitere dieser Tec1-reprimierten Gene sind wichtig für spätere Ereignisse im Zellzyklus, wie *RNR1* oder *HCM1*. *RNR1* codiert für die große Untereinheit der Ribonukleotid-Diphosphat-Reduktase, die für das Fortschreiten der S-Phase benötigt wird (Elledge & Davis, 1990; Yao *et al.*, 2003). Hcm1 ist ein "Forkhead"-Transkriptionsfaktor, der für die S-Phasen-spezifische Transkription benötigt wird und der die G2/M-Progression beeinflusst (Pramila *et al.*, 2006; White *et al.*, 2009).

Tab. 3.1: Gene, die durch Tec1 negativ reguliert werden und die die Zellgröße beeinflussen

Gen	Zellzyklus-spezifische Expression ¹	Phänotyp einer Einzeldelektion ²	
		Zellzyklus	Zellgröße
<i>ARX1</i>	keine	kein	verkleinert
<i>DBP3</i>	keine	verspätete G1-Phase	
<i>FKS1</i>	G1-Phase	kein	
<i>ISM1</i>	keine	kein	
<i>LTV1</i>	keine	kein	
<i>MAC1</i>	keine	verspätete G1-Phase	
<i>MEC3</i>	G2-Phase	kein	
<i>NOG1</i>	keine	kein	
<i>RAI1</i>	keine	kein	
<i>RPA190</i>	keine	kein	
<i>RPA49</i>	keine	verlängerte G1-Phase	
<i>SFP1</i>	keine	Zellgröße an START verkleinert verspätete G1-Phase	
<i>SLT2</i>	S-Phase	kein	
<i>SSZ1</i>	keine	verlängerte G1-Phase	
<i>TUF1</i>	keine	kein	
<i>AAC3</i>	keine	kein	vergrößert
<i>BUR2</i>	keine	verspätete G1-Phase	
<i>CLB2</i>	M-Phase	verspätete M-Phase	
<i>CYC8</i>	keine	kein	
<i>DBF2</i>	M-Phase	kein	
<i>DEG1</i>	keine	kein	
<i>EMW1</i>	keine	anormale Zellzyklusprogression in der G1-Phase	
<i>GIM3</i>	keine	kein	
<i>GPA1</i>	M/G1-Phase	Arrest in der G1-Phase	
<i>GPM2</i>	keine	kein	
<i>HCM1</i>	G1-Phase	verspäteter G2/M-Übergang	
<i>IES6</i>	keine	kein	
<i>KAR3</i>	G1-Phase	kein	
<i>LDB7</i>	keine	kein	
<i>MCM7</i>	M-Phase	Arrest in der S-Phase	
<i>PIN4</i>	keine	kein	
<i>QDR2</i>	keine	kein	
<i>RNR1</i>	G1-Phase	Arrest in der S-Phase	
<i>RSC1</i>	keine	verlängerte G1-Phase	
<i>SHE4</i>	keine	kein	
<i>SLX8</i>	keine	kein	
<i>SST2</i>	M/G1-Phase	kein	
<i>TIR3</i>	keine	kein	

¹ Spellman *et al.*, 1998.² Saccharomyces Genome Database (www.yeastgenome.org).

Weitere Beispiele für Tec1-Zielgene, die wichtig für die Zellzyklusprogression sind, sind das Cyclin-Gen *CLB2* und *DBF2*. Dbf2 ist eine Kinase, die für den Austritt aus der Mitose benötigt wird (Toyn & Johnston, 1994). Tec1 kann also das effiziente Fortschreiten des Zellzyklus unterdrücken, indem es die Expression von Genen hemmt, die an verschiedenen Stellen des Zellzyklus benötigt werden. Diese Gene, wenn sie

z. B. bei Tec1-Mangel normal exprimiert werden, sorgen dafür, dass die Zellen eine bestimmte Größe nicht überschreiten.

Viele Zielgene von Tec1 sind aber auch Gene, die für die Regulation der Ribosomenbiogenese benötigt werden. Auch das rRNA-Synthese-Gen *SRD1* ist ein Zielgen von Tec1, das Ste12-abhängig stark negativ reguliert wird. Die Deletion vieler Ribosomenbiogenese-Gene führt zu kleineren Zellen (Jorgensen *et al.*, 2002). Tec1 reguliert das Gen für den Hauptregulator der Ribosomenbiogenese, *SFP1*, negativ. Wie in Abschnitt 1.3.3 beschrieben, wird *SFP1* nährstoffabhängig durch TOR1 kontrolliert und beeinflusst die Zellgröße durch die Steuerung der Translationsmaschinerie (Jorgensen *et al.*, 2004; Marion *et al.*, 2004). Auch Tec1 wird von TOR1 kontrolliert (Brückner *et al.*, 2011). Dies könnte bedeuten, dass Tec1 zelluläres Wachstum und Zellgröße nicht nur über die Zellzykluskontrolle, sondern auch über die Wachstumskontrolle regulieren kann.

3.3.5.2 Die Regulation der Zellgröße durch Msa1 und Msa2

Msa1 wird für die Aktivierung von G1-spezifischen Genen durch die Transkriptionsfaktorkomplexe MBF und SBF benötigt, wobei der Zeitpunkt der Aktivierung eine wichtige Rolle spielt (Ashe *et al.*, 2008). Ein *MSA1*-Mangel verzögert diesen Zeitpunkt und führt dazu, dass die Zellen länger in der G1-Phase verbleiben, sodass sie während dieser Zeit stärker an Größe zunehmen, als Zellen mit ausreichend *MSA1*. Es war bereits bekannt, dass Msa1, Mbp1 und Swi4 am *CLN2*-Promotor binden können (Ashe *et al.*, 2008). *CLN2* ist ein wichtiges Zielgen von SBF, das für die Progression des Zellzyklus benötigt wird (Hadwiger *et al.*, 1989; Wittenberg & Reed, 2005). Aufgrund der Ähnlichkeit zu Msa1 wird für Msa2 eine analoge Funktion bei der Zellzykluskontrolle vermutet (Ashe *et al.*, 2008). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Msa2 ebenfalls am *CLN2*-Promotor binden kann und dass es einen positiven Einfluss auf die *CLN2*-Transkription hat (Abb. 3.4). Msa1 und Msa2 führen also ähnliche Funktionen bei der Regulation der G1-spezifischen Transkription zusammen mit SBF und MBF aus.

Es ist auch denkbar, dass Msa2 die Zellgröße auch zusätzlich durch die Beeinflussung der G2/M-spezifischen Transkription reguliert. Dafür spricht, dass die Abwesenheit von Msa2 zu größeren Veränderungen der Zellgröße führt, als die Abwesenheit von Msa1.

Tab. 3.2: Gene, die durch Msa2 positiv reguliert werden und die die Zellgröße beeinflussen

Gen	Zellzyklus-spezifische Expression ¹	Phänotyp einer Einzeldelektion ²	
		Zellzyklus	Zellgröße
<i>AEP2</i>	keine	kein	verkleinert
<i>ALG13</i>	keine	kein	
<i>ATP14</i>	keine	kein	
<i>COX7</i>	keine	kein	
<i>CYT1</i>	keine	kein	
<i>ERG28</i>	keine	kein	
<i>FRA2</i>	keine	kein	
<i>GLO3</i>	keine	kein	
<i>GUP1</i>	keine	kein	
<i>HAP4</i>	keine	kein	
<i>HTB1</i>	S-Phase	kein	
<i>KAP122</i>	keine	kein	
<i>MRPL31</i>	keine	kein	
<i>MTG1</i>	keine	kein	
<i>PHO5</i>	M-Phase	kein	
<i>QCR10</i>	keine	kein	
<i>RPL12B</i>	keine	verlängerte G1-Phase	
<i>RPL19A</i>	keine	verspätete G1-Phase	
<i>RPL31A</i>	keine	verspätete G1-Phase	
<i>RPL37B</i>	keine	verspätete G1-Phase	
<i>RPL39</i>	keine	verlängerte G1-Phase	
<i>RPS10A</i>	keine	verlängerte G1-Phase	
<i>RPS19B</i>	keine	kein	
<i>RPS1B</i>	keine	verlängerte G1-Phase	
<i>SWE1</i>	G1-Phase	verfrühter G2/M-Übergang	
<i>AKR1</i>	keine	kein	vergrößert
<i>ALG13</i>	keine	kein	
<i>BDF1</i>	keine	kein	
<i>BET1</i>	keine	kein	
<i>BUL1</i>	keine	kein	
<i>GIM4</i>	keine	kein	
<i>GSH1</i>	keine	kein	
<i>GWT1</i>	G1-Phase	kein	
<i>HRR25</i>	keine	kein	
<i>HSL1</i>	G1-Phase	verlängerte G1-Phase	
<i>IRA2</i>	keine	kein	
<i>LOA1</i>	keine	verlängerte G1-Phase	
<i>MSS4</i>	keine	kein	
<i>PKC1</i>	keine	kein	
<i>PMP1</i>	M-Phase	kein	
<i>RAD27</i>	G1-Phase	kein	
<i>RNR1</i>	G1-Phase	Arrest in der S-Phase	
<i>RPN12</i>	keine	anormale Zellzyklusprogression	
<i>RPT2</i>	keine	Zellgröße an START vergrößert	
<i>SRB5</i>	keine	kein	
<i>SRV2</i>	keine	kein	
<i>THP3</i>	M-Phase	kein	

¹ Spellman *et al.*, 1998.² Saccharomyces Genome Database (www.yeastgenome.org).

Die bioinformatische Analyse der Gene, die positiv durch Msa2 reguliert werden, hat außerdem ergeben, dass sie angereichert für eine Bindung durch den Transkriptionsfaktor Rpn4 sind. Rpn4 wird für eine effiziente G2/M-Transkription benötigt (White *et al.*, 2009). Weiterhin konnten 22 Gene identifiziert werden, die positiv durch Msa2 reguliert sind und deren Einzeldelation jeweils zu einer Vergrößerung der Zellen führt (Tab. 3.2). 7 dieser Gene werden auch durch Rpn4 oder Fkh1 reguliert. Fkh1 ist ein Transkriptionsfaktor, der zusammen mit Fkh1 und Mcm1 den G2/M-Übergang positiv beeinflusst (Kumar *et al.*, 2000).

Es gibt aber auch positive Effekte von Msa2 auf Zellgröße: Msa2 kann eine Vielzahl von Genen negativ regulieren, die für ribosomale Proteine codieren und die durch die Transkriptionsfaktoren Sfp1, Fhl1 und Rap1 reguliert werden (Tab. 2.3) (Maddock *et al.*, 1994; Lieb *et al.*, 2001; Jorgensen *et al.*, 2002). Die Deletion vieler Gene, die für ribosomale Proteine codieren, führt wegen der Verringerung der Translationsrate und der daraus resultierenden Abnahme des Wachstums zu kleineren Zellen (Jorgensen *et al.*, 2002). Msa2 wird also auch benötigt, um die Bedingungen für Wachstum zu regulieren, gleichzeitig ist Msa2 durch seine Funktion im Zellteilungszyklus wichtig für die zeitliche Koordination der Zellteilung. Da *msa2Δ*-Zellen größer als die eines Kontrollstammes sind, überwiegt unter den in dieser Arbeit untersuchten guten Nährstoffbedingungen, wie bei Tec1, die Kontrolle des Zellzyklus durch Msa2.

3.3.6 Funktionelle Interaktionen zwischen Msa1 und Msa2

Bisher wurde angenommen, dass Msa1 und Msa2, obwohl sie nur 28 % identische Aminosäuren besitzen, redundante Funktionen bei der Kontrolle der G1-spezifischen Transkription und damit bei der Zellgrößenregulation ausführen (Ashe *et al.*, 2008). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass beide Proteine einen negativen Effekt auf die Zellgröße haben, und dass dieser Effekt wahrscheinlich mit der Zellzykluskontrolle durch Msa1 und Msa2 zusammenhängt. Auch bei der neu identifizierten Funktion von Msa1 und Msa2, die *FLO11*-abhängige Biofilmbildung zu beeinflussen, wurde eine funktionelle Überlappung der beiden Proteine gefunden. Unerwartet war jedoch, dass in der Transkriptomanalyse mit *msa1Δ*- und *msa2Δ*-Einzelmutanten nur eine sehr geringe Menge an co-regulierten Genen (7 von 582; 1,2 %) gefunden wurden. Es muss also spezifische Funktionen von Msa1 und Msa2

geben. Hierfür spricht auch, dass nur Msa1 mit Stel2 interagieren kann und dass nur Msa1 an *MSB2* bindet. Zudem reguliert Msa1 die meisten seiner Zielgene negativ, während Msa2 einen überwiegend positiven Einfluss auf die Transkription seiner Zielgene hat. Eventuell ist diese funktionelle Spezifität von Msa1 und Msa2 im $\Sigma 1278b$ -Hintergrund stärker als in anderen *S. cerevisiae*-Stämmen, da Msa1 aus $\Sigma 1278b$ im Vergleich zu Msa1 aus S288c 6 Aminosäureaustausche besitzt. 5 dieser Modifikationen liegen im N-Terminus von Msa1, einem Bereich, der eine größere Ähnlichkeit zu Msa2 aufweist, als der Msa1-C-Terminus.

Vergleicht man die Transkriptprofile der Einzelmутanten mit dem der Doppelmутante, fällt auf, dass bei der Doppelmутante 96 Gene differentiell exprimiert sind, die in den Einzelmутanten nicht anders exprimiert sind (Abb. 2.14B). 66 Gene sind ausschließlich in Abwesenheit von Msa1 differentiell exprimiert. Umgekehrt sind 452 Gene in Abwesenheit von Msa2 anders reguliert, aber nicht in Abwesenheit von Msa1 oder in Abwesenheit von beiden Proteinen. Die Expression von *MSA1* oder *MSA2* war jeweils in Abwesenheit des anderen Gens nicht verändert und auch in den Immunoblot-Analysen waren keine signifikanten Änderungen der Msa1- oder Msa2-Proteinmengen in Abwesenheit des jeweils anderen zu detektieren. Daher müssen sich Msa1 und Msa2 bei der Ausführung ihrer Funktionen gegenseitig beeinflussen.

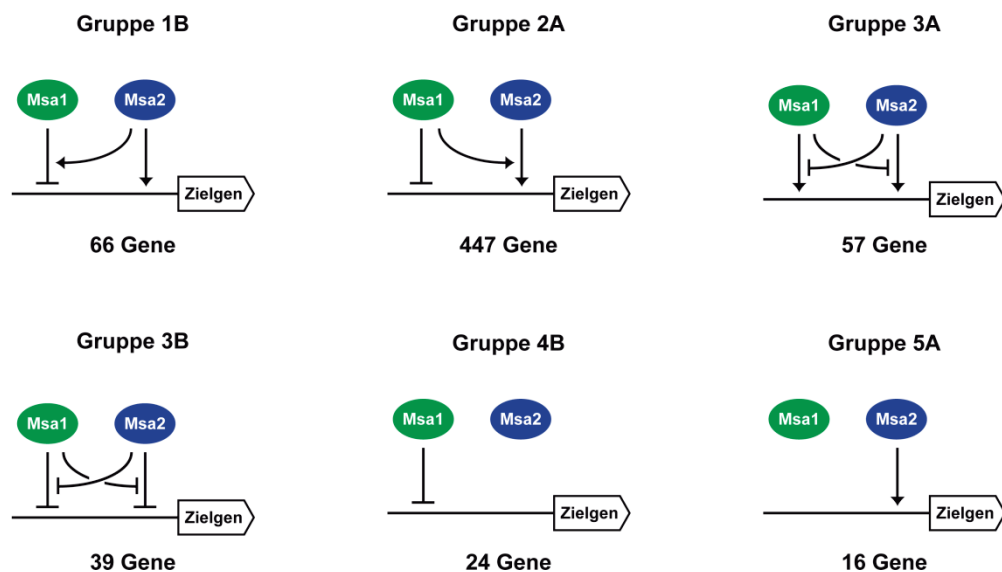
Insgesamt ergeben sich 26 mögliche Expressionsmuster für Msa1- und Msa2-Zielgene, die in 7 Gruppen eingeteilt werden können (Abb. 3.5A). Die meisten der Gene, die im Transkriptionsprofil als Msa1- und/oder Msa2-reguliert charakterisiert wurden, nämlich 649 von 671 insgesamt Genen (96,7 %), fallen in 6 Expressionsmuster. Die drei prominentesten Muster sind in Abb. 3.5B dargestellt. Das Expressionsmuster, das mit 447 von 671 Genen (66,6 %) am häufigsten vertreten ist, kann durch ein Modell erklärt werden, in dem Msa1 als Repressor und Msa2 als Aktivator fungiert, der unter positiver Kontrolle von Msa1 steht (Abb. 3.5B, Gruppe 2A). Diese Gruppe umfasst Msa2-Zielgene, die für Ribosomenstruktur und Translation wichtig sind, sowie Gene, die mit Membran- und Mitochondrienfunktionen assoziiert sind (siehe auch Tab. 2.3). Auch *FUS1* und *CLN2* sowie *RPII* gehören in diese Klasse. Beim zweithäufigsten Regulationsmuster mit 66 von 671 Genen (9,8 %) fungiert Msa1 ebenfalls als Repressor und Msa2 als Aktivator, jedoch steht hier die Msa1-Funktion unter positiver Kontrolle von Msa2 (Abb. 3.5B, Gruppe 1B). Diese Gruppe umfasst Zielgene von Msa1, die bei der Aminosäurebiosynthese und der Konjugation eine Rolle spielen.

A

			Gruppe 1 nur <i>msa1Δ</i> (66 Gene)		Gruppe 2 nur <i>msa2Δ</i> (452 Gene)		Gruppe 3 nur <i>msa1Δ msa2Δ</i> (96 Gene)	
Expression	Msa1	Msa2	A (0 Gene)	B (66 Gene)	A (447 Gene)	B (5 Gene)	A (57 Gene)	B (39 Gene)
	+	+	normal	normal	normal	normal	normal	normal
	-	+	verringert	erhöht	normal	normal	normal	normal
	+	-	normal	normal	verringert	erhöht	normal	normal
	-	-	normal	normal	normal	normal	verringert	erhöht

			Gruppe 4 <i>msa1Δ</i> und <i>msa1Δ msa2Δ</i> (26 Gene)				Gruppe 5 <i>msa2Δ</i> und <i>msa1Δ msa2Δ</i> (24 Gene)			
Expression	Msa1	Msa2	A (2 Gene)	B (24 Gene)	C (0 Gene)	D (0 Gene)	A (16 Gene)	B (0 Gene)	C (8 Gene)	D (0 Gene)
	+	+	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal
	-	+	verringert	erhöht	verringert	erhöht	normal	normal	normal	normal
	+	-	normal	normal	normal	normal	verringert	erhöht	verringert	erhöht
	-	-	verringert	erhöht	erhöht	verringert	verringert	erhöht	erhöht	verringert

			Gruppe 6 <i>msa1Δ</i> und <i>msa2Δ</i> (3 Gene)				Gruppe 7 <i>msa1Δ</i> und <i>msa2Δ</i> und <i>msa1Δ msa2Δ</i> (4 Gene)							
Expression	Msa1	Msa2	A (2 Gene)	B (1 Gen)	C (0 Gene)	D (0 Gene)	A (4 Gene)	B (0 Gene)	C (0 Gene)	D (0 Gene)	E (0 Gene)	F (0 Gene)	G (0 Gene)	H (0 Gene)
	+	+	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal
	-	+	verringert	erhöht	verringert	erhöht	verringert	erhöht	verringert	erhöht	verringert	erhöht	verringert	erhöht
	+	-	verringert	erhöht	erhöht	verringert	verringert	erhöht	verringert	erhöht	verringert	erhöht	verringert	erhöht
	-	-	normal	normal	normal	normal	verringert	erhöht	erhöht	verringert	erhöht	verringert	erhöht	verringert

B**Abb. 3.5: Expressionsmuster von Msa1- und Msa2-regulierten Genen**

A) Auflistung und Klassifizierung aller möglichen Expressionsmuster von Msa1- und Msa2-regulierten Genen, die in folgende Gruppen eingeteilt werden können: Regulation nur im *msa1Δ*-Stamm (Gruppe 1), Regulation nur im *msa2Δ*-Stamm (Gruppe 2), Regulation nur im *msa1Δ msa2Δ*-Stamm (Gruppe 3), oder in verschiedenen Kombinationen aus Einzelmутanten und Doppelmутanten (Gruppen 4-7). Die Expressionsmuster sind eingeteilt in verschiedene Untergruppen (A-H), die die Regulation der Gene in der betreffenden Untergruppe in Anwesenheit (+) oder Abwesenheit (-) von Msa1 und/oder Msa2 angeben. **B)** Modelle der funktionellen Interaktionen zwischen Msa1 und Msa2 bei der Zielgenkontrolle. Gezeigt sind Modelle für die häufigsten 6 Expressionsmuster. Die Zielgenkontrolle durch Msa1 und Msa2 kann direkt oder indirekt sein. Msa1 und Msa2 wirken promotorabhängig als Aktivatoren oder Repressoren. Für Details siehe Text.

Weitere 96 Gene sind in Gruppe 3 zusammengefasst, bei der entweder Msa1 und Msa2 beide als Aktivatoren wirken und sich gegenseitig negativ in ihrer Funktion beeinflussen (Gruppe 3A), oder Msa1 und Msa2 beide als Repressoren wirken, die sich

gegenseitig positiv in ihrer Funktion beeinflussen (Gruppe 3B). *FLO11* und *MSB2* gehören zu Gruppe 3A, wie auch Gene, die bei der Proteinfaltung benötigt werden. Gruppe 3B umfasst Gene der Hitzeschockantwort, sowie das in den ChIP-Analysen untersuchte *SRL3*. Die genaue Funktion von *SRL3* ist noch unbekannt, eine Überexpression kann jedoch eine *RAD53*-Deletion supprimieren (Desany *et al.*, 1998). Rad53 ist eine Kinase, die für einen Zellzyklusarrest bei DNA-Schädigung benötigt wird (Allen *et al.*, 1994). Srl3 wird zudem von Cdc28 phosphoryliert (Übersax *et al.*, 2003). Die meisten der verbleibenden Msa1- und Msa2-Zielgene gehören in Gruppen, in denen entweder Msa1 als Repressor oder Msa2 als Aktivator wirkt und das jeweils andere Protein keinen Einfluss auf die Funktion des anderen hat (Abb. 3.5B, Gruppen 4B und 5A). Die 24 Gene aus Gruppe 4B sind wie auch viele Tec1-regulierte Gene angereichert für eine Bindung durch den Transkriptionsfaktor Gcn4. Die 16 Gene der Gruppe 5A sind angereichert für eine Bindung durch MBF. Hierzu gehören *RNR1*, *HO* und *NDD1*, die vor allem wichtig für die Replikation sind und zellzyklusabhängig exprimiert werden (Kostriken *et al.*, 1983; Elledge & Davis, 1990; Loy *et al.*, 1999; Yao *et al.*, 2003).

3.3.7 *In-vivo*-Analyse der Signaltransduktionsdynamik im Fus3/Kss1-MAPK-Modul

Die in Abschnitt 3.3 diskutierten Resultate zeigen, dass das während dieser Arbeit aufgebaute System zur *in-vivo*-Analyse der Fus3/Kss1-MAPK-Modulaktivität funktionell ist. Es verhält sich unter definierten Bedingungen wie gutem Nährstoffangebot, Nährstoffmangel oder unter Konjugationsbedingungen erwartungsgemäß und dynamisch. Regulationsmuster und Modalitäten der transkriptionellen Programme wurden bestimmt und sind reproduzierbar. Das System kann also für quantitative Messungen unter der Einwirkung weiterer Signale oder synthetisch induzierter Veränderungen genutzt werden. Durch seinen modularen Aufbau lässt es sich vielfältig erweitern und modifizieren.

Das System wird auch bereits für Einzelzellanalysen verwendet, um Zell-zu-Zell-Variationen zu determinieren und so die Flexibilität und Stabilität des Systems näher zu beleuchten. Zudem werden Reaktionskinetiken bestimmt und Mikroskopiebilder werden nach Unterschieden zwischen der Zellkern- und der Cytoplasmafluoreszenz ausgewertet (K. Bandmann, unveröffentlichte Resultate). Durch diese Untersuchung

und Eingrenzung des Parameterraums wird die Erstellung eines mathematischen Modells der Signaltransduktion im Fus3/Kss1-MAPK-Modul erleichtert. Basierend auf den so ermittelten regulatorischen Prinzipien von MAPK-Modulen ist zukünftig auch die Herstellung synthetischer Module mit neuen Eigenschaften denkbar.

3.4 TEA-Transkriptionsfaktoren als Integrationsplattformen für die Regulation von Wachstum und Differenzierung

Die vorliegende Arbeit gibt neue Einblicke in die kombinatorische und promotorspezifische Kontrolle bei der Regulation von Wachstum und Differenzierung durch TEA-Transkriptionsfaktoren. Bekannte Interaktoren von TEA-Transkriptionsfaktoren sind beispielsweise in *Drosophila* Vestigial und im Mensch Vgll1 ("Vestigial-like 1"), die mit Scalloped bzw. TEF-Proteinen Komplexe bilden können. Ähnlich wie Tec1 und Ste12 in *S. cerevisiae*, sind Scalloped und Vestigial an der Transkription von entwicklungsspezifischen Genen bei der Flügelentstehung und Zellzyklusgenen beteiligt (Halder *et al.*, 1998; Paumard-Rigal *et al.*, 1998; Simmonds *et al.*, 1998; Delanoue *et al.*, 2004). Die Sequenzähnlichkeiten von Vestigial und Ste12 sind aber nur sehr gering. Es wurde außerdem eine Interaktion zwischen Scalloped/TEF-1-4 und den Co-Aktivatoren Yorkie/YAP gefunden (Cao *et al.*, 2008; Goulev *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008). Yorkie/YAP sind an der Regulation der Zellproliferation und der Apoptose beteiligt und konnten bisher nur in Metazoen identifiziert werden (Huang *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2010). Yorkie spielt auch bei der G1/S-Transkription eine Rolle und ist für die Inhibierung der Apoptose zuständig (Cao *et al.*, 2008).

Yorkie/YAP sind Substrate des relativ neu entdeckten, evolutionär konservierten Hippo-Signalweges, der bei der Regulation von Organgröße und Gewebedifferenzierung als Antwort auf Differenzierungssignale wichtig ist (Zhao *et al.*, 2011; Varelas & Wrana, 2012). Es wird angenommen, dass bei Stimulation verschiedene Regulatoren am Anfang dieses Signalweges, unter anderem auch ein Protein der Ras-Familie, Signale produzieren, die einen Wachstumsstopp verursachen. Diese Signale werden dann über Hippo/Mst- und Warts/Lats-Kinasen mit Hilfe von Adapterproteinen auf die Co-Aktivatoren Yorkie/YAP übertragen (Chen *et al.*, 2010) (Abb. 3.6).

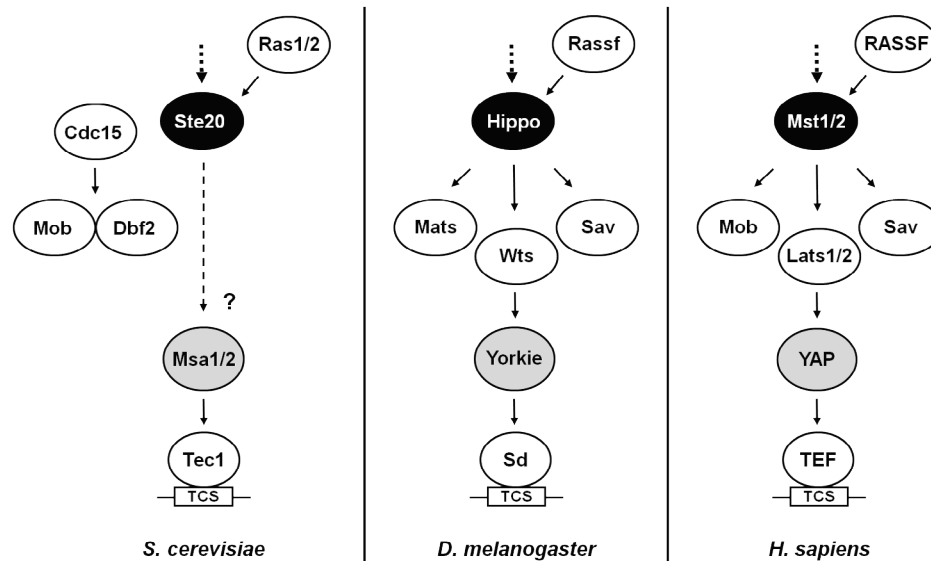


Abb. 3.1: Komponenten des Hippo-Signalwegs in *S. cerevisiae*, *D. melanogaster* und *H. sapiens*

Gezeigt sind die Kernkomponenten des Hippo-Signalwegs: die Hippo-Kinasen Ste20/Hippo/Mst1/2, die Adaptorproteine Mob/Mats und Salvador (Sav), die Kinasen Warts (Wts)/Lats1/2, die Co-Aktivatoren Yorkie/YAP und die TEA-Regulatoren Tec1/Scalloped (Sd)/TEF. Proteine der Ras-Familie wie Ras1/2/Rassf/RASSF können die Aktivität von Hippo-Kinasen beeinflussen. Für die Kinasen Cdc15 und Dbf2 aus *S. cerevisiae* wird eine Assoziation mit dem Hippo-Signalweg vermutet. Ob die in dieser Arbeit neu identifizierten Tec1-Interaktionspartner Msa1 und Msa2 analog zu Yorkie/YAP sind, ist noch unklar. Modifiziert nach Hilman & Gat, 2011.

Yorkie/YAP besitzen keine DNA-Bindedomäne, vermitteln aber starke Transkriptionsaktivierung, wenn sie mit DNA-Bindeproteinen assoziieren (Yagi *et al.*, 1999). Die Phosphorylierung von Yorkie/YAP durch die vorgelagerten Kinasen beeinflusst ihre Kernlokalisierung. Geringe Hippo-Aktivität begünstigt die Lokalisierung von Yorkie/YAP im Kern. Eine hohe Aktivität der Hippo-Kinase führt zur cytoplasmatischen Lokalisierung der Faktoren, wo sie mit Proteinen der 14-3-3-Familie assoziieren (Dong *et al.*, 2007). Im Cytoplasma kann YAP weitere Funktionen bei der Wachstumskontrolle ausführen. YAP interagiert beispielsweise mit dem Inhibitor Smad7, der die TGF- β -Rezeptoraktivität hemmt. Fehlfunktionen des Hippo-Signalwegs können zu unkontrollierten Organwachstum und Tumorentstehung führen, was letztendlich Krebs verursachen kann (Zhao *et al.*, 2010; Varelas & Wrana, 2012). TEA-Transkriptionsfaktoren sind wichtige Interaktoren von Yorkie/YAP. Auf struktureller Ebene interagiert TEF-1 mit YAP, ähnlich wie TEF-4 mit Vgll1, und wie Scalloped mit Vestigial, obwohl die Aminosäuresequenzen von Vgll1 und YAP nicht sehr ähnlich sind (Pobbati *et al.*, 2012). Des Weiteren wird eine Co-Evolution von YAP und TEA-Proteinen postuliert (Hilman & Gat, 2011). Zudem gibt es in *Drosophila* Hinweise, dass Yorkie auch mit Vestigial interagieren kann (Giot *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2005; Bandura & Edgar, 2008). Die genauen Mechanismen der programm-

spezifischen Kontrolle durch Scalloped und Yorkie oder TEF und YAP sind noch weitgehend unklar (Varelas & Wrana, 2012).

Auch *S. cerevisiae* enthält mit Tec1 als TEA-Faktor und Ste20 als ursprüngliche Hippo/Mst-Kinase Komponenten dieses Signalweges (Abb. 3.6). Es besteht die Annahme, dass das Fus3/Kss1-MAPK-Modul eine ursprüngliche Version des Hippo-Signalweges repräsentiert. Außerdem wird vermutet, dass die Kinasen Cdc15 und Dbf2, die für den Austritt aus der Mitose benötigt werden, Vorläufer von Hippo-Komponenten sind. Orthologe für Yorkie/YAP konnten in *S. cerevisiae* bisher jedoch noch nicht identifiziert werden (Hilman & Gat, 2011). *S. cerevisiae* enthält aber möglicherweise Tec1-Interaktoren, die analog zu Yorkie/YAP aus Metazoen sind. In der vorliegenden Arbeit wurden die Co-Regulatoren Msa1 und Msa2 als Interaktionspartner von Tec1 identifiziert. Obwohl Msa1 und Msa2 pilzspezifisch sind, ist es denkbar, dass sie in höheren Eukaryoten durch YAP-ähnliche Proteine ersetzt wurden, um eine bessere Kontrolle der längeren, oft komplexer regulierten Promotoren in Metazoen zu ermöglichen. Ste12 könnte als Interaktionspartner von Yorkie/YAP-ähnlichen Proteinen ebenfalls eine Rolle spielen, da in dieser Arbeit auch die Interaktion von Ste12 mit Msa1 nachgewiesen wurde. Zudem enthält *S. cerevisiae* mit Bmh1 und Bmh2 auch 14-3-3-Proteine, die unter anderem für das Pseudohyphenwachstum benötigt werden, über Ras- und TOR-Signalwege gesteuert werden und mit Ste12 interagieren (Roberts *et al.*, 1997). Interessanterweise ist *DBF2* auch ein Tec1-Zielgen (Tab. 3.1). Ob Msa1 und Msa2 tatsächlich YAP-ähnliche TEA-Interaktionspartner sind, bleibt noch zu untersuchen. Insgesamt zeigt aber die mögliche Vernetzung von Tec1 mit einem weiteren Signalweg, dass TEA-Transkriptionsfaktoren bei der Kontrolle von Wachstum und Differenzierung als Integrationsplattformen für eine Vielzahl von Signalwegen fungieren.

4 Material

4.1 Geräte

Tab. 4.1: Geräte und Gerätehersteller

Gerät	Hersteller
"GelDoc XR" DNA- Geldokumentationsanlage	BIO-RAD LABORATORIES GMBH (München, D)
"NanoDrop [®] ND-1000" Spektralphotometer	THERMO FISHER SCIENTIFIC (Waltham, MA, USA)
"Vibrax Basic" Multivortexer	IKA [®] -WERKE GMBH (Staufen, D)
"WPA Biowave CO8000" Spektralphotometer	BIOCHROM LTD. (Cambridge, GB)
Analysegerät "Agilent 2100 Bioanalyzer"	AGILENT TECHNOLOGIES DEUTSCHLAND GMBH (Böblingen, D)
CCD-Kamera "1394 ORCA-ERA"	HAMAMATSU PHOTONICS DEUTSCHLAND GMBH (Herrsching, D)
Chemolumineszenz-Detektion "ChemoCam Imager HR16-3200"	INTAS SCIENCE IMAGING INSTRUMENTS GMBH (Göttingen, D)
Digitalkamera "Canon Power Shot A620"	CANON DEUTSCHLAND GMBH (Krefeld, D)
DNA-Gelelektrophoreseapparaturen	BIO-RAD LABORATORIES GMBH (München, D) und Elektronikwerkstatt der Philipps-Universität Marburg
Fluoreszenzmikroskop "Axio Imager A1"	CARL ZEISS AG (Oberkochen, D)
Fluoreszenzmikroskop "Axiovert 200M"	CARL ZEISS AG (Oberkochen, D)
GeneChip [®] Fluidics Station 450	AFFYMETRIX UK LTD. (High Wycombe, GB)
GeneChip [®] Scanner 3000	AFFYMETRIX UK LTD. (High Wycombe, GB)
Hybridisierungssofen "HYBRID Mini 38"	HERAEUS HOLDING GMBH (Hanau, D)
Hybridisierungssofen für Microarrays	AFFYMETRIX UK LTD. (High Wycombe, GB)
Mikrotiterplatten-Lesegerät "Model 680 Microplate Reader"	BIO-RAD LABORATORIES GMBH (München, D)
Partikelanalysegerät "Multisizer TM 3"	BECKMAN COULTER GMBH (Krefeld, D)
PCR-Maschinen "Primus 25 advanced" und "Primus 96 advanced"	PEQLAB BIOTECHNOLOGIE GMBH (Erlangen, D)
Protein-Gelelektrophoreseapparaturen "Mini-PROTEAN [®] 3"	BIO-RAD LABORATORIES GMBH (München, D)
Realtime PCR-Detektierungssystem "MyiQ TM Single-Color"	BIO-RAD LABORATORIES GMBH (München, D)
Roller Mixer "SRT6"	BIBBY SCIENTIFIC LTD. (Staffordshire, GB)
Rotator "SB3"	BIBBY SCIENTIFIC LTD. (Staffordshire, GB)
Stand-Kühlzentrifuge "4K-15"	SIGMA LABORZENTRIFUGEN GMBH (Osterode, D)
Tischzentrifugen "Biofuge pico" und "Biofuge fresco"	HERAEUS HOLDING GMBH (Hanau, D)

Gerät	Hersteller
Ultraschall-Homogenisator "Sonopuls HD 3100"	BANDELIN ELECTRONIC GMBH & CO. KG (Berlin, D)
UV-Strahlungsgerät "Stratalinker 1800"	AGILENT TECHNOLOGIES DEUTSCHLAND GMBH (Böblingen, D)

4.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen CARL ROTH GMBH + CO. KG (Karlsruhe, D), GE HEALTHCARE (München, D), SIGMA-ALDRICH CHEMIE GMBH (Steinheim, D) und VWR INTERNATIONAL GMBH (Darmstadt, D) bezogen.

4.3 Enzyme, Größenstandards und Kits

Tab. 4.2: Hersteller von Enzymen, Größenstandards und Kits

Produkt	Hersteller
Restriktionsendonukleasen	THERMO FISHER SCIENTIFIC (Waltham, MA, USA) (ehemals FERMENTAS GMBH, St. Leon-Rot, D)
KOD-Polymerase	MERCK KGAA (Darmstadt, D)
Pfu-Polymerase	THERMO FISHER SCIENTIFIC (Waltham, MA, USA) (ehemals FERMENTAS GMBH, St. Leon-Rot, D)
Phusion-Polymerase	THERMO FISHER SCIENTIFIC (Waltham, MA, USA) (ehemals FINNZYMES, Espoo, FI)
Taq-Polymerase	NEW ENGLAND BIOLABS INC. (Ipswich, MA, USA)
T4 DNA-Ligase	ROCHE DEUTSCHLAND HOLDING GMBH (Grenzach-Wyhlen, D)
DNA-Ligase	THERMO FISHER SCIENTIFIC (Waltham, MA, USA) (ehemals FERMENTAS GMBH, St. Leon-Rot, D)
DNA-Größenstandard "Generuler™ DNA Ladder Mix"	THERMO FISHER SCIENTIFIC (Waltham, MA, USA) (ehemals FERMENTAS GMBH, St. Leon-Rot, D)
Plasmid Mini Prep Kit	METABION INTERNATIONAL AG (Martinsried, D)
Miniprep Kit "QIAprep Spin"	QIAGEN (Hilden, D)
RNA-Extraktionskit "RNeasy Mini Kit"	QIAGEN (Hilden, D)
Gelextraktions-Kit "E.Z.N.A"	VWR INTERNATIONAL GMBH (Darmstadt, D)
Gelextraktions-Kit "QIAquick"	QIAGEN (Hilden, D)
Protein-Größenstandard "Prestained Protein Molecular Weight Marker"	THERMO FISHER SCIENTIFIC (Waltham, MA, USA) (ehemals FERMENTAS GMBH, St. Leon-Rot, D)

4.4 Auftragsarbeiten

DNA-Sequenzierungen wurden von SEQLAB - SEQUENCE LABORATORIES GÖTTINGEN GMBH (Göttingen, D) durchgeführt. Oligonukleotide wurden von METABION INTERNATIONAL AG (Martinsried, D) und MICROSYNTH AG (Balgach, CH) hergestellt.

4.5 Nährmedien

Die verwendeten Nährmedien und Stammlösungen sind in Tab. 4.3 aufgeführt. Das gewünschte Endvolumen wurde durch Auffüllen mit dH₂O erreicht. Bei Festmedien wurde 2 % Agar zugegeben. Kohlenstoffquellen und Histidin, Leucin, Tryptophan und Uracil wurden nach dem Autoklavieren zugesetzt.

Tab. 4.3: Zusammensetzung von Nährmedien und Stammlösungen

Name	Zusammensetzung
Aminosäure-Mischung	<ul style="list-style-type: none"> • Je 2 g Adenin, Alanin, Arginin, Asparagin, Aspartat, Cystein, Glutamin, Glutamat, Glycin, Isoleucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tyrosin und Valin • 0,2 g para-Aminobenzoat
LB-Medium ("lysogeny <u>b</u> roth")	1 % (w/v) Pepton aus tryptisch verdaulichem Casein 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1 % (w/v) NaCl
LFM ("low fluorescent <u>m</u> edium")	10 % (v/v) Salz-Stammlösung 0,1 % (v/v) Spurenelemente-Stammlösung 0,1 % (v/v) Vitamin-Stammlösung
Salz-Stammlösung (10×)	5 % (w/v) (NH ₄) ₂ SO ₄ 1 % (w/v) KH ₂ PO ₄ 0,5 % (w/v) MgSO ₄ 0,1 % (w/v) NaCl 0,1 % (w/v) CaCl ₂
SC-Medium ("synthetic <u>c</u> omplete")	0,15 % (w/v) YNB 0,5 % (w/v) Ammoniumsulfat 0,2 mM Inositol 0,2 % (w/v) Aminosäure-Mischung
SOB-Medium ("super <u>o</u> ptimal <u>b</u> roth")	2 % (w/v) Trypton pankreatisch verdaut 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 2,5 mM KCl 10 mM NaCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄

Name	Zusammensetzung
SOC-Medium ("super optimal broth with catabolite repression")	SOB-Medium + 20 mM Glucose
Spurenelemente-Stammlösung	0,05 % (w/v) H_3BO_4 0,004 % (w/v) $CuSO_4$ 0,01 % (w/v) KI 0,02 % (w/v) $FeCl_3$ 0,04 % (w/v) $MnSO_4$ 0,02 % (w/v) Na_2MoO_4 0,04 % (w/v) $ZnSO_4$
Vitamin-Stammlösung	0,0002 % (w/v) Biotin 0,04 % (w/v) Calcium-Pantothenat 0,2 % (w/v) Inositol 0,04 % (w/v) Niacin 0,02 % (w/v) para-Aminobenzoat 0,04 % (w/v) Pyridoxin-HCl 0,04 % (w/v) Thiamin-HCl
YNB-Medium ("yeast nitrogen base")	0,15 % (w/v) YNB 0,5 % (w/v) Ammoniumsulfat 0,2 mM Myo-Inositol
YPD-Medium ("yeast extract, peptone, dextrose")	2 % (w/v) Pepton aus tryptisch verdaulichem Casein 1 % (w/v) Hefeextrakt 2 % (w/v) Glucose
YPG-Medium ("yeast extract, peptone, galactose")	2 % (w/v) Pepton aus tryptisch verdaulichem Casein 1 % (w/v) Hefeextrakt 2 % (w/v) Galaktose

4.6 Antibiotika

Die in Tab. 4.4 aufgeführten Antibiotika wurden Fest- oder Flüssigmedien nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ungefähr 60 °C zugegeben. Die Stammlösungen wurden mit dH₂O angesetzt.

Tab. 4.4: Antibiotika

Name	Stammlösung	Endkonzentration	Bezugsquelle
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml	CARL ROTH GMBH + CO. KG (Karlsruhe, D)
Geneticin (G418)	200 mg/ml	200 µg/ml	CARL ROTH GMBH + CO. KG (Karlsruhe, D)
Hygromycin B	50 mg/ml	300 µg/ml	CARL ROTH GMBH + CO. KG (Karlsruhe, D)
Nourseothricin (ClonNAT)	200 mg/ml	100 µg/ml	WERNER BIOAGENTS (Jena, D)

4.7 Antikörper

Tab. 4.5: Antikörper

Bezeichnung	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer
Goat anti-Cdc28 (polyklonal)	1:2000	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY INC. (Santa Cruz, CA, USA)	sc-6709
Rabbit anti-GST (polyklonal)	1:2000	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY INC. (Santa Cruz, CA, USA)	sc-459
Goat anti-Rabbit (Peroxidase-gekoppelt)	1:5000	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY INC. (Santa Cruz, CA, USA)	sc-2054
Goat anti-Mouse (Peroxidase-gekoppelt)	1:3000	JACKSON IMMUNO RESEARCH LTD. (Suffolk, GB)	115-035-003
Mouse anti-Myc (monoklonal)	1:5000	CELL SIGNALING TECHNOLOGY INC. (Danvers, MA, USA)	2276
Rabbit anti-Tec1 (polyklonal)	1:5000	PINEDA ANTIKÖRPER-SERVICE (Berlin, D)	–
Mouse anti- α -Tubulin (monoklonal)	1:1000	MERCK KGAA (Darmstadt, D)	CP06
Donkey anti-Goat (Peroxidase-gekoppelt)	1:2000	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY INC. (Santa Cruz, CA, USA)	sc-2020

4.8 Polyacrylamid-Gele

Tab. 4.6: Zusammensetzung von Polyacrylamidgelen

Chemikalie	Trenngel	Sammelgel
Rotiphorese® Gel 30 (CARL ROTH) (30 % Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1)	12 %	3 %
dH ₂ O	1,75 ml	1,95 ml
4× Upper Tris (pH 6,8)	–	0,75 ml
4× Lower Tris (pH 8,8)	1,25 ml	–
10 % APS	12,5 µl	20 µl
TEMED	7,5 µl	10 µl

4.9 Stämme und Plasmide

4.9.1 *E. coli*-Stämme

Tab. 4.7: *E. coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>) 7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>nupG</i> <i>endA1</i>	Casadaban & Cohen, 1980
DH5 α	F ⁻ Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺) <i>phoA</i> <i>supE44</i> λ - <i>thi-1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i>	Hanahan, 1983

4.9.2 *S. cerevisiae*-Stämme

Die in dieser Arbeit verwendeten *S. cerevisiae*-Stämme sind in Tab. 4.8 angegeben. Wenn nicht anders angegeben, wurden Hefestämme aus dem genetischen Σ 1278b-Hintergrund verwendet. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Genfusionen und Gendeletionen am genomischen Locus wurde eine PCR-basierte Methode durchgeführt, unter Verwendung der entsprechenden S1- und S2- oder S2- und S3-Primer (Janke *et al.*, 2004). Die Überprüfung der genetischen Manipulationen erfolgte mittels PCR mit Gen-spezifischen "KO"- oder "Tag"-Primern. *CFP*-Reporter und *TEC1-STE12*- oder *TEC1-MSA*-Hybridkonstrukte wurden mit Hilfe von integrativen Plasmiden ins *S. cerevisiae*-Genom eingebracht und ihre Integration mittels Southern-Hybridisierung überprüft.

Tab. 4.8: *S. cerevisiae*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
EGY48-p1840	<i>MATa</i> <i>ura3</i> <i>his3::hisG</i> <i>trp1::hisG</i> <i>lexAop-lacZ-URA3</i> S288c	Golemis & Brent, 1992
RH2500 (YHUM610)	<i>MATa</i> <i>tec1</i> $\Delta::HIS3$ <i>ura3-52</i> <i>leu2::hisG</i> <i>trp1::hisG</i>	Köhler <i>et al.</i> , 2002
RH2501 (YHUM639)	<i>MATa</i> <i>tec1</i> $\Delta::HIS3$ <i>ste12</i> $\Delta::TRP1$ <i>ura3-52</i> <i>leu2::hisG</i> <i>trp1::hisG</i>	Köhler <i>et al.</i> , 2002
RH2662 (YHUM924)	<i>MATa</i> <i>flo11</i> $\Delta::kanR$ <i>ura3-52</i>	Brückner <i>et al.</i> , 2004
RH2754	<i>MATa</i> <i>ura3-52</i> <i>leu2::hisG</i> <i>trp1::hisG</i>	Köhler <i>et al.</i> , 2002
RH2755 (YHUM680)	<i>MATa</i> <i>ste12</i> $\Delta::TRP1$ <i>ura3-52</i> <i>leu2::hisG</i> <i>trp1::hisG</i>	Köhler <i>et al.</i> , 2002
RH2765 (YHUM1363)	RH2500 mit <i>TCS-CYC1-lacZ::URA3</i>	Köhler <i>et al.</i> , 2002

Stamm	Genotyp	Referenz
RH2768 (YHUM1791)	RH2500 mit <i>TCS-PRE-CYC1-lacZ::URA3</i>	Köhler <i>et al.</i> , 2002
RH2774 (YHUM1364)	RH2501 mit <i>TCS-CYC1-lacZ::URA3</i>	Köhler <i>et al.</i> , 2002
RH2777 (YHUM1792)	RH2501 mit <i>TCS-PRE-CYC1-lacZ::URA3</i>	Köhler <i>et al.</i> , 2002
YHUM0043	<i>MATa ura3-52 leu2::hisG his3::hisG trp1::hisG</i>	Stammsammlung AG Mösch
YHUM0069	<i>MATa his1 S288c</i>	Stammsammlung AG Mösch
YHUM0070	<i>MATa his1 S288c</i>	Stammsammlung AG Mösch
YHUM0215	<i>MATa ura3-52 his3::hisG trp1::hisG</i>	Stammsammlung AG Mösch
YHUM0216	<i>MATa ura3-52 leu2::hisG his3::hisG</i>	Stammsammlung AG Mösch
YHUM0306	<i>MATa ura3-52 leu2::hisG trp1::hisG</i>	Stammsammlung AG Mösch
YHUM0811 (RH3160)	<i>MATa ura3-52 his3::hisG TRP1 tec1Δ::HIS3 TEC1(P)-Myc3-TEC1::LEU2 ste7Δ::kanMX6</i>	Brückner <i>et al.</i> , 2004
YHUM0913	<i>MATa ura3-52 leu2::hisG trp1::hisG gen4Δ::LEU2</i>	Stammsammlung AG Mösch
YHUM1048	RH2500 mit <i>TRP1</i>	Stammsammlung AG Mösch
YHUM1408	<i>MATa ura3-52 cdc42Δ::HIS3 CDC42^{T58M}::LEU2 ade2::URA3 barΔ::kanMX6</i>	Stammsammlung AG Mösch
YHUM1630	RH2765 mit <i>LEU2</i>	van der Felden, 2008
YHUM1631	RH2765 mit <i>URA3(P)-TEC1::LEU2</i>	van der Felden, 2008
YHUM1634	RH2765 mit <i>URA3(P)-TEC1^{I-280}::LEU2</i>	van der Felden, 2008
YHUM1635	RH2765 mit <i>URA3(P)-TEC1^{I-280}-TEC1³⁷⁷⁻⁴⁸⁶::LEU2</i>	van der Felden, 2008
YHUM1637	RH2774 mit <i>URA3(P)-TEC1::LEU2</i>	van der Felden, 2008
YHUM1640	RH2774 mit <i>URA3(P)-TEC1^{I-280}::LEU2</i>	van der Felden, 2008
YHUM1641	RH2774 mit <i>URA3(P)-TEC1^{I-280}-TEC1³⁷⁷⁻⁴⁸⁶::LEU2</i>	van der Felden, 2008
YHUM1642	RH2774 mit <i>URA3(P)-TEC1^{I-280}-STE12^{I-688}::LEU2</i>	van der Felden, 2008
YHUM1643	RH2774 mit <i>URA3(P)-TEC1^{I-280}-STE12^{I-250}::LEU2</i>	van der Felden, 2008
YHUM1644	RH2774 mit <i>URA3(P)-TEC1^{I-280}-STE12^{I-400}::LEU2</i>	van der Felden, 2008
YHUM1645	RH2774 mit <i>URA3(P)-TEC1^{I-280}-STE12³⁸⁰⁻⁶⁸⁸::LEU2</i>	van der Felden, 2008
YHUM1646	RH2774 mit <i>URA3(P)-TEC1^{I-280}-STE12^{I-688}- TEC1³⁷⁷⁻⁴⁸⁶::LEU2</i>	van der Felden, 2008
YHUM1647	RH2774 mit <i>URA3(P)-TEC1^{I-280}-STE12^{I-250}- TEC1³⁷⁷⁻⁴⁸⁶::LEU2</i>	van der Felden, 2008
YHUM1648	RH2774 mit <i>URA3(P)-TEC1^{I-280}-STE12^{I-400}- TEC1³⁷⁷⁻⁴⁸⁶::LEU2</i>	van der Felden, 2008

Stamm	Genotyp	Referenz
YHUM1649	RH2774 mit <i>URA3(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-STE12³⁸⁰⁻⁶⁸⁸-TEC1³⁷⁷⁻⁴⁸⁶::LEU2</i>	van der Felden, 2008
YHUM1676	RH2501 mit <i>URA3(P)-TEC1::LEU2</i>	Heise <i>et al.</i> , 2010
YHUM1688	RH2500 mit <i>URA3(P)-TEC1::LEU2</i>	Stammsammlung AG Mösch
YHUM1692	RH2501 mit <i>TEC1(P)-TEC1::LEU2</i>	Stammsammlung AG Mösch
YHUM1694	RH2500 mit <i>TEC1(P)-TEC1::LEU2</i>	Heise <i>et al.</i> , 2010
YHUM1695	<i>MATa ura3-52 his3::hisG tec1Δ::HIS3 TEC1(P)-TEC1^{T273M}::LEU2 trp1::hisG</i>	Stammsammlung AG Mösch
YHUM1700	RH2500 mit <i>LEU2</i>	Heise <i>et al.</i> , 2010
YHUM1701	<i>MATa tec1Δ::HIS3 ste12Δ::TRP1 ura3-52</i>	Heise <i>et al.</i> , 2010
YHUM1702	YHUM1694 mit <i>TCS-CYC1-lacZ::URA3</i>	Stammsammlung AG Mösch
YHUM1718	YHUM1676 mit <i>TCS-CYC1-lacZ::URA3</i>	Heise <i>et al.</i> , 2010
YHUM1720	YHUM1649 mit <i>dig1Δ::kanMX6</i>	Heise <i>et al.</i> , 2010
YHUM1727	<i>MATa tec1Δ::HIS3 URA3(P)-TEC1::LEU2 TCS-CYC1-lacZ::URA3</i>	Heise <i>et al.</i> , 2010
YHUM1733	RH2768 mit <i>URA3(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-TEC1³⁷⁷⁻⁴⁸⁶::LEU2</i>	Heise <i>et al.</i> , 2010
YHUM1734	RH2777 mit <i>URA3(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-TEC1³⁷⁷⁻⁴⁸⁶::LEU2</i>	Heise <i>et al.</i> , 2010
YHUM1735	RH2777 mit <i>URA3(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰::LEU2</i>	Heise <i>et al.</i> , 2010
YHUM1736	RH2768 mit <i>URA3(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰::LEU2</i>	Heise <i>et al.</i> , 2010
YHUM1737	RH2777 mit <i>URA3(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-STE12¹⁻⁶⁸⁸-TEC1³⁷⁷⁻⁴⁸⁶::LEU2</i>	Heise <i>et al.</i> , 2010
YHUM1738	RH2777 mit <i>URA3(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-STE12³⁸⁰⁻⁶⁸⁸-TEC1³⁷⁷⁻⁴⁸⁶::LEU2</i>	Heise <i>et al.</i> , 2010
YHUM1739	RH2777 mit <i>URA3(P)-TEC1::LEU2</i>	Heise <i>et al.</i> , 2010
YHUM1740	RH2768 mit <i>URA3(P)-TEC1::LEU2</i>	Heise <i>et al.</i> , 2010
YHUM1743	YHUM1727 mit <i>dig1Δ::kanMX6</i>	Heise <i>et al.</i> , 2010
YHUM1744	YHUM1718 mit <i>dig1Δ::kanMX6</i>	Heise <i>et al.</i> , 2010
YHUM1745	YHUM1644 mit <i>dig1Δ::kanMX6</i>	Heise <i>et al.</i> , 2010
YHUM1746	YHUM1645 mit <i>dig1Δ::kanMX6</i>	Heise <i>et al.</i> , 2010
YHUM1747	YHUM1648 mit <i>dig1Δ::kanMX6</i>	Heise <i>et al.</i> , 2010
YHUM1749	RH2768 mit <i>TEC1(P)-TEC1::LEU2</i> BHUM1258 (<i>TEC1(P)-TEC1::LEU2</i>) wurde mit <i>BstEII</i> verdaut und in RH2768 integriert. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels Southern-Hybridisierung mit einer <i>TEC1</i> -spezifischen Sonde.	diese Arbeit
YHUM1750	RH2777 mit <i>TEC1(P)-TEC1::LEU2</i> BHUM1258 (<i>TEC1(P)-TEC1::LEU2</i>) wurde mit <i>BstEII</i> verdaut und in RH2777 integriert. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels Southern-Hybridisierung mit einer <i>TEC1</i> -spezifischen Sonde.	diese Arbeit
YHUM1751	RH2777 mit <i>URA3(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-STE12¹⁻²⁵⁰-TEC1³⁷⁷⁻⁴⁸⁶::LEU2</i> BHUM1363 (<i>URA3(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-STE12¹⁻²⁵⁰-TEC1³⁷⁷⁻⁴⁸⁶::LEU2</i>) wurde mit <i>BstEII</i> verdaut und in RH2777 integriert. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels Southern-Hybridisierung mit einer <i>TEC1</i> -spezifischen Sonde.	diese Arbeit

Stamm	Genotyp	Referenz
YHUM1752	RH2777 mit <i>URA3(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-STE12¹⁻⁴⁰⁰-TEC1³⁷⁷⁻⁴⁸⁶::LEU2</i> BHUM1364 (<i>URA3(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-STE12¹⁻⁴⁰⁰-TEC1³⁷⁷⁻⁴⁸⁶::LEU2</i>) wurde mit <i>BstEII</i> verdaut und in RH2777 integriert. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels Southern-Hybridisierung mit einer <i>TEC1</i> -spezifischen Sonde.	diese Arbeit
YHUM1773	YHUM216 mit <i>TEC1-YFP::HIS5</i>	Weisser, 2009
YHUM1773	YHUM216 mit <i>TEC1-YFP::HIS5</i>	Weisser, 2009
YHUM1774	YHUM216 mit <i>STE12-YFP::HIS5</i>	Weisser, 2009
YHUM1775	YHUM216 mit <i>DIG1-YFP::HIS5</i>	Weisser, 2009
YHUM1776	YHUM216 mit <i>DIG2-YFP::HIS5</i>	Weisser, 2009
YHUM1777	YHUM215 mit <i>DIG1-RFP::kanMX6</i>	Weisser, 2009
YHUM1778	YHUM215 mit <i>DIG2-RFP::kanMX6</i>	Weisser, 2009
YHUM1846	RH2777 mit <i>URA3(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-STE12¹⁻⁶⁸⁸::LEU2</i> BHUM1357 (<i>URA3(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-STE12¹⁻⁶⁸⁸::LEU2</i>) wurde mit <i>BstEII</i> verdaut und in RH2777 integriert. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels Southern-Hybridisierung mit einer <i>TEC1</i> -spezifischen Sonde.	diese Arbeit
YHUM1847	RH2777 mit <i>URA3(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-STE12¹⁻²⁵⁰::LEU2</i> BHUM1358 (<i>URA3(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-STE12¹⁻²⁵⁰::LEU2</i>) wurde mit <i>BstEII</i> verdaut und in RH2777 integriert. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels Southern-Hybridisierung mit einer <i>TEC1</i> -spezifischen Sonde.	diese Arbeit
YHUM1848	RH2777 mit <i>URA3(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-STE12¹⁻⁴⁰⁰::LEU2</i> BHUM1359 (<i>URA3(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-STE12¹⁻⁴⁰⁰::LEU2</i>) wurde mit <i>BstEII</i> verdaut und in RH2777 integriert. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels Southern-Hybridisierung mit einer <i>TEC1</i> -spezifischen Sonde.	diese Arbeit
YHUM1849	RH2777 mit <i>URA3(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-STE12³⁸⁰⁻⁶⁸⁸::LEU2</i> BHUM1360 (<i>URA3(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-STE12³⁸⁰⁻⁶⁸⁸::LEU2</i>) wurde mit <i>BstEII</i> verdaut und in RH2777 integriert. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels Southern-Hybridisierung mit einer <i>TEC1</i> -spezifischen Sonde.	diese Arbeit
YHUM1864	YHUM1694 mit <i>msa1Δ::hphNT1</i>	diese Arbeit
YHUM1865	YHUM1694 mit <i>msa2Δ::natNT2</i>	diese Arbeit
YHUM1866	YHUM1676 mit <i>msa1Δ::hphNT1</i>	diese Arbeit
YHUM1867	YHUM1676 mit <i>msa2Δ::natNT2</i>	diese Arbeit
YHUM1868	YHUM1700 mit <i>msa1Δ::hphNT1</i>	diese Arbeit
YHUM1869	YHUM1700 mit <i>msa2Δ::natNT2</i>	diese Arbeit
YHUM1872	YHUM1702 mit <i>msa1Δ::hphNT1</i>	diese Arbeit
YHUM1873	YHUM1702 mit <i>msa2Δ::natNT2</i>	diese Arbeit
YHUM1874	YHUM1673 mit <i>msa1Δ::hphNT1</i>	diese Arbeit
YHUM1875	YHUM1637 mit <i>msa2Δ::natNT2</i>	diese Arbeit
YHUM1880	YHUM1631 mit <i>msa1Δ::hphNT1</i>	diese Arbeit
YHUM1881	YHUM1631 mit <i>msa2Δ::natNT2</i>	diese Arbeit
YHUM1882	YHUM1688 mit <i>msa1Δ::hphNT1</i>	diese Arbeit
YHUM1883	YHUM1688 mit <i>msa2Δ::natNT2</i>	diese Arbeit
YHUM1897	YHUM1873 mit <i>msa1Δ::hphNT1</i>	diese Arbeit
YHUM1899	YHUM1881 mit <i>msa1Δ::hphNT1</i>	diese Arbeit
YHUM1900	YHUM1865 mit <i>msa1Δ::hphNT1</i>	diese Arbeit

Stamm	Genotyp	Referenz
YHUM1901	YHUM1868 mit <i>msa1Δ::hphNT1</i>	diese Arbeit
YHUM1902	YHUM1883 mit <i>msa1Δ::hphNT1</i>	diese Arbeit
YHUM1911	YHUM1773 mit TCS- <i>CYCI-CFP::LEU2</i> BHUM1716 (TCS- <i>CYCI-CFP::LEU2</i>) wurde mit <i>BstEII</i> verdaut und in YHUM1773 integriert. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels PCR und Southern-Hybridisierung mit einer <i>CFP</i> -spezifischen Sonde.	diese Arbeit
YHUM1912	YHUM1773 mit FRE- <i>CYCI-CFP::LEU2</i> BHUM1717 (FRE- <i>CYCI-CFP::LEU2</i>) wurde mit <i>BstEII</i> verdaut und in YHUM1773 integriert. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels PCR und Southern-Hybridisierung mit einer <i>CFP</i> -spezifischen Sonde.	diese Arbeit
YHUM1915	YHUM1774 mit FRE- <i>CYCI-CFP::LEU2</i> BHUM1717 (FRE- <i>CYCI-CFP::LEU2</i>) wurde mit <i>BstEII</i> verdaut und in YHUM1774 integriert. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels PCR und Southern-Hybridisierung mit einer <i>CFP</i> -spezifischen Sonde.	diese Arbeit
YHUM1916	YHUM1774 mit <i>FUSI(UAS)-CFP::LEU2</i> BHUM1718 (<i>FUSI(UAS)-CFP::LEU2</i>) wurde mit <i>BstEII</i> verdaut und in YHUM1774 integriert. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels PCR und Southern-Hybridisierung mit einer <i>CFP</i> -spezifischen Sonde.	diese Arbeit
YHUM1950	YHUM1773 mit 2×TCS- <i>CYCI-CFP::LEU2</i> BHUM1754 (2×TCS- <i>CYCI-CFP::LEU2</i>) wurde mit <i>BstEII</i> verdaut und in YHUM1773 integriert. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels PCR und Southern-Hybridisierung mit einer <i>CFP</i> -spezifischen Sonde.	diese Arbeit
YHUM1951	YHUM1774 mit 2×TCS- <i>CYCI-CFP::LEU2</i> BHUM1754 (2×TCS- <i>CYCI-CFP::LEU2</i>) wurde mit <i>BstEII</i> verdaut und in YHUM1774 integriert. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels PCR und Southern-Hybridisierung mit einer <i>CFP</i> -spezifischen Sonde.	diese Arbeit
YHUM1952	YHUM1912 mit FRE- <i>CYCI-RFP::URA3</i> BHUM1724 (FRE- <i>CYCI-RFP::URA3</i>) wurde mit <i>EcoRV</i> verdaut und in YHUM1912 integriert. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels PCR und Southern-Hybridisierung mit einer <i>RFP</i> -spezifischen Sonde.	diese Arbeit
YHUM1955	YHUM1916 mit FRE- <i>CYCI-RFP::URA3</i> BHUM1724 (FRE- <i>CYCI-RFP::URA3</i>) wurde mit <i>EcoRV</i> verdaut und in YHUM1916 integriert. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels PCR und Southern-Hybridisierung mit einer <i>RFP</i> -spezifischen Sonde.	diese Arbeit
YHUM1957	YHUM1916 mit <i>FUSI(UAS)-RFP::URA3</i> BHUM1725 (<i>FUSI(UAS)-RFP::URA3</i>) wurde mit <i>EcoRV</i> verdaut und in YHUM1916 integriert. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels PCR und Southern-Hybridisierung mit einer <i>RFP</i> -spezifischen Sonde.	diese Arbeit
YHUM1958	YHUM1993 mit FRE- <i>CYCI-YFP::URA3</i> BHUM1859 (FRE- <i>CYCI-YFP::URA3</i>) wurde mit <i>EcoRV</i> verdaut und in YHUM1993 integriert. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels PCR und Southern-Hybridisierung mit einer <i>YFP</i> -spezifischen Sonde.	diese Arbeit
YHUM1959	YHUM1916 mit FRE- <i>CYCI-RFP::URA3</i> BHUM1724 (FRE- <i>CYCI-RFP::URA3</i>) wurde mit <i>EcoRV</i> verdaut und in YHUM1916 integriert. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels PCR und Southern-Hybridisierung mit einer <i>RFP</i> -spezifischen Sonde.	diese Arbeit
YHUM1960	YHUM1912 mit <i>ste7Δ::hphNT1</i>	diese Arbeit

Stamm	Genotyp	Referenz
YHUM1961	YHUM1913 mit <i>ste7Δ::hphNT1</i>	diese Arbeit
YHUM1962	YHUM1915 mit <i>ste7Δ::hphNT1</i>	diese Arbeit
YHUM1963	YHUM1916 mit <i>ste7Δ::hphNT1</i>	diese Arbeit
YHUM1964	YHUM1915 mit <i>tec1Δ::natNT2</i>	diese Arbeit
YHUM1966	YHUM1913 mit <i>barΔ::kanMX6</i> <i>BAR1</i> wurde durch Insertion einer <i>barΔ::kanMX6</i> -Kassette deletiert. Diese wurde mit Primern MBbar1up und MBbar1down aus genomischer DNA von YHUM1408 amplifiziert. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels PCR und Hemmhof-Messung bei Pheromon.	diese Arbeit
YHUM1972	YHUM1773 mit <i>CYC1(ΔUAS)-CFP::LEU2</i> BHUM1773 (<i>CYC1(ΔUAS)-CFP::LEU2</i>) wurde mit <i>BstEII</i> verdaut und in YHUM1773 integriert. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels PCR und Southern-Hybridisierung mit einer <i>CFP</i> -spezifischen Sonde.	diese Arbeit
YHUM1981	YHUM1867 mit <i>msa1Δ::hphNT1</i>	diese Arbeit
YHUM1983	YHUM1875 mit <i>msa1Δ::hphNT1</i>	diese Arbeit
YHUM1987	YHUM216 mit <i>STE12-RFP::kanMX6</i>	diese Arbeit
YHUM1988	YHUM1773 mit <i>FLO11(P)-CFP::LEU2</i> BHUM1858 (<i>FLO11(P)-CFP::LEU2</i>) wurde mit <i>BstEII</i> verdaut und in YHUM2181 integriert. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels PCR und Southern-Hybridisierung mit einer <i>CFP</i> -spezifischen Sonde.	diese Arbeit
YHUM1988	YHUM1773 mit <i>FLO11(P)-CFP::LEU2</i> BHUM1858 (<i>FLO11(P)-CFP::LEU2</i>) wurde mit <i>BstEII</i> verdaut und in YHUM1773 integriert. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels PCR und Southern-Hybridisierung mit einer <i>CFP</i> -spezifischen Sonde.	diese Arbeit
YHUM1989	YHUM1774 mit <i>FLO11(P)-CFP::LEU2</i> BHUM1858 (<i>FLO11(P)-CFP::LEU2</i>) wurde mit <i>BstEII</i> verdaut und in YHUM1774 integriert. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels PCR und Southern-Hybridisierung mit einer <i>CFP</i> -spezifischen Sonde.	diese Arbeit
YHUM1993	YHUM1987 mit <i>FRE-CYC1-CFP::LEU2</i> BHUM1717 (<i>FRE-CYC1-CFP::LEU2</i>) wurde mit <i>BstEII</i> verdaut und in YHUM1987 integriert. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels PCR und Southern-Hybridisierung mit einer <i>CFP</i> -spezifischen Sonde.	diese Arbeit
YHUM1995	YHUM1694 mit <i>MSA1-ProA::kanMX6</i>	diese Arbeit
YHUM1996	YHUM1694 mit <i>MSA2-ProA::kanMX6</i>	diese Arbeit
YHUM1997	YHUM1700 mit <i>MSA1-ProA::kanMX6</i>	diese Arbeit
YHUM1998	YHUM1700 mit <i>MSA2-ProA::kanMX6</i>	diese Arbeit
YHUM1999	YHUM1864 mit <i>MSA2-ProA::kanMX6</i>	diese Arbeit
YHUM2000	YHUM1865 mit <i>MSA1-ProA::kanMX6</i>	diese Arbeit
YHUM2027	YHUM1901 mit <i>TEC1(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-MSA1::URA3</i> BHUM1935 (<i>TEC1(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-MSA1::URA3</i>) wurde mit <i>EcoRV</i> verdaut und in YHUM1901 integriert. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels Southern-Hybridisierung mit einer <i>TEC1</i> -spezifischen Sonde.	diese Arbeit
YHUM2028	YHUM1901 mit <i>TEC1(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-MSA2::URA3</i> BHUM1936 (<i>TEC1(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-MSA2::URA3</i>) wurde mit <i>EcoRV</i> verdaut und in YHUM1901 integriert. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels Southern-Hybridisierung mit einer <i>TEC1</i> -spezifischen Sonde.	diese Arbeit

Stamm	Genotyp	Referenz
YHUM2029	YHUM1901 mit <i>URA3(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-MSA1::URA3</i> BHUM1937 (<i>URA3(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-MSA1::URA3</i>) wurde mit <i>EcoRV</i> verdaut und in YHUM1901 integriert. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels Southern-Hybridisierung mit einer <i>TEC1</i> -spezifischen Sonde.	diese Arbeit
YHUM2030	YHUM1901 mit <i>URA3(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-MSA2::URA3</i> BHUM1938 (<i>URA3(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-MSA2::URA3</i>) wurde mit <i>EcoRV</i> verdaut und in YHUM1901 integriert. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels Southern-Hybridisierung mit einer <i>TEC1</i> -spezifischen Sonde.	diese Arbeit
YHUM2032	YHUM1868 mit <i>URA3(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-MSA2::URA3</i> BHUM1938 (<i>URA3(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-MSA2::URA3</i>) wurde mit <i>EcoRV</i> verdaut und in YHUM1868 integriert. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels Southern-Hybridisierung mit einer <i>TEC1</i> -spezifischen Sonde.	diese Arbeit
YHUM2033	YHUM1868 mit <i>URA3(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-MSA1::URA3</i> BHUM1937 (<i>URA3(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-MSA1::URA3</i>) wurde mit <i>EcoRV</i> verdaut und in YHUM1868 integriert. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels Southern-Hybridisierung mit einer <i>TEC1</i> -spezifischen Sonde.	diese Arbeit
YHUM2034	YHUM1869 mit <i>TEC1(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-MSA2::URA3</i> BHUM1936 (<i>TEC1(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-MSA2::URA3</i>) wurde mit <i>EcoRV</i> verdaut und in YHUM1869 integriert. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels Southern-Hybridisierung mit einer <i>TEC1</i> -spezifischen Sonde.	diese Arbeit
YHUM2035	YHUM1869 mit <i>URA3(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-MSA2::URA3</i> BHUM1938 (<i>URA3(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-MSA2::URA3</i>) wurde mit <i>EcoRV</i> verdaut und in YHUM1869 integriert. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels Southern-Hybridisierung mit einer <i>TEC1</i> -spezifischen Sonde.	diese Arbeit
YHUM2050	YHUM1988 mit <i>msa1Δ::hphNT1</i>	diese Arbeit
YHUM2051	YHUM1988 mit <i>msa2Δ::natNT2</i>	diese Arbeit
YHUM2052	YHUM2051 mit <i>msa1Δ::hphNT1</i>	diese Arbeit
YHUM2097	YHUM1694 mit <i>MSA1-Myc³::kanMX6</i>	diese Arbeit
YHUM2098	YHUM1694 mit <i>MSA2-Myc³::kanMX6</i>	diese Arbeit
YHUM2099	YHUM1700 mit <i>MSA1-Myc³::kanMX6</i>	diese Arbeit
YHUM2100	YHUM1700 mit <i>MSA2-Myc³::kanMX6</i>	diese Arbeit
YHUM2101	YHUM694 mit <i>TEC1-YFP::HIS5</i>	diese Arbeit
YHUM2102	YHUM695 mit <i>TEC1^{T273M}-YFP::HIS5</i>	diese Arbeit
YHUM2153	YHUM1995 mit <i>STE12-Myc⁹::hphNT1</i>	diese Arbeit
YHUM2154	YHUM1995 mit <i>MBP1-Myc⁹::hphNT1</i>	diese Arbeit
YHUM2155	YHUM1995 mit <i>SWI4-Myc⁹::hphNT1</i>	diese Arbeit
YHUM2157	YHUM1996 mit <i>STE12-Myc⁹::hphNT1</i>	diese Arbeit
YHUM2158	YHUM1996 mit <i>MBP1-Myc⁹::hphNT1</i>	diese Arbeit
YHUM2159	YHUM1996 mit <i>SWI4-Myc⁹::hphNT1</i>	diese Arbeit
YHUM2161	YHUM1997 mit <i>STE12-Myc⁹::hphNT1</i>	diese Arbeit
YHUM2162	YHUM1997 mit <i>MBP1-Myc⁹::hphNT1</i>	diese Arbeit
YHUM2163	YHUM1997 mit <i>SWI4-Myc⁹::hphNT1</i>	diese Arbeit
YHUM2164	YHUM1998 mit <i>STE12-Myc⁹::hphNT1</i>	diese Arbeit
YHUM2165	YHUM1998 mit <i>MBP1-Myc⁹::hphNT1</i>	diese Arbeit
YHUM2166	YHUM1998 mit <i>SWI4-Myc⁹::hphNT1</i>	diese Arbeit
YHUM2167	YHUM1694 mit <i>Myc⁹-TEC1::hphNT1</i>	diese Arbeit

Stamm	Genotyp	Referenz
YHUM2168	YHUM1694 mit <i>STE12- Myc⁹::hphNT1</i>	diese Arbeit
YHUM2169	YHUM2168 mit <i>TEC1-ProA::kanMX6</i>	diese Arbeit
YHUM2170	YHUM2170 mit <i>msa1Δ::natNT2</i>	diese Arbeit
YHUM2171	YHUM1694 mit <i>MBP1- Myc⁹::hphNT1</i>	diese Arbeit
YHUM2172	YHUM2171 mit <i>TEC1-ProA::kanMX6</i>	diese Arbeit
YHUM2173	YHUM2172 mit <i>msa1Δ::natNT2</i>	diese Arbeit
YHUM2174	YHUM1694 mit <i>SWI4- Myc⁹::hphNT1</i>	diese Arbeit
YHUM2175	YHUM2174 mit <i>TEC1-ProA::kanMX6</i>	diese Arbeit
YHUM2176	YHUM2175 mit <i>msa1Δ::natNT2</i>	diese Arbeit
YHUM2179	YHUM1048 mit <i>msa2Δ::natNT2</i>	diese Arbeit
YHUM2180	YHUM2179 mit <i>msa1Δ::hphNT1</i>	diese Arbeit
YHUM2181	YHUM2180 mit <i>TEC1(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-MSA1::URA3</i> BHUM1935 (<i>TEC1(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-MSA1::URA3</i>) wurde mit <i>EcoRV</i> verdaut und in YHUM2180 integriert. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels Southern-Hybridisierung mit einer <i>TEC1</i> -spezifischen Sonde.	diese Arbeit
YHUM2182	YHUM2180 mit <i>TEC1(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-MSA2::URA3</i> BHUM1936 (<i>TEC1(P)-TEC1¹⁻²⁸⁰-MSA2::URA3</i>) wurde mit <i>EcoRV</i> verdaut und in YHUM2180 integriert. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels Southern-Hybridisierung mit einer <i>TEC1</i> -spezifischen Sonde.	diese Arbeit
YHUM2183	YHUM2181 mit <i>2×TCS-CYCI-CFP::LEU2</i> BHUM1754 (<i>2×TCS-CYCI-CFP::LEU2</i>) wurde mit <i>BstEII</i> verdaut und in YHUM2181 integriert. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels PCR und Southern-Hybridisierung mit einer <i>CFP</i> -spezifischen Sonde.	diese Arbeit
YHUM2184	YHUM2182 mit <i>2×TCS-CYCI-CFP::LEU2</i> BHUM1754 (<i>2×TCS-CYCI-CFP::LEU2</i>) wurde mit <i>BstEII</i> verdaut und in YHUM2182 integriert. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels PCR und Southern-Hybridisierung mit einer <i>CFP</i> -spezifischen Sonde.	diese Arbeit
YHUM2186	YHUM1048 mit <i>2×TCS-CYCI-CFP::LEU2</i> BHUM1754 (<i>2×TCS-CYCI-CFP::LEU2</i>) wurde mit <i>BstEII</i> verdaut und in YHUM1048 integriert. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels PCR und Southern-Hybridisierung mit einer <i>CFP</i> -spezifischen Sonde.	diese Arbeit
YHUM2187	YHUM2186 mit <i>URA3</i> YIplac211 (<i>URA3</i>) wurde mit <i>EcoRV</i> verdaut und in YHUM2186 integriert.	diese Arbeit
YHUM2188	YHUM2180 mit <i>2×TCS-CYCI-CFP::LEU2</i> BHUM1754 (<i>2×TCS-CYCI-CFP::LEU2</i>) wurde mit <i>BstEII</i> verdaut und in YHUM2180 integriert. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels PCR und Southern-Hybridisierung mit einer <i>CFP</i> -spezifischen Sonde.	diese Arbeit
YHUM2190	YHUM2193 mit <i>URA3</i> YIplac211 (<i>URA3</i>) wurde mit <i>EcoRV</i> verdaut und in YHUM2193 integriert.	diese Arbeit
YHUM2191	YHUM2181 mit <i>FLO11(P)-CFP::LEU2</i> BHUM1858 (<i>FLO11(P)-CFP::LEU2</i>) wurde mit <i>BstEII</i> verdaut und in YHUM2181 integriert. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels PCR und Southern-Hybridisierung mit einer <i>CFP</i> -spezifischen Sonde.	diese Arbeit

Stamm	Genotyp	Referenz
YHUM2192	YHUM2182 mit <i>FLO11(P)-CFP::LEU2</i> BHUM1858 (<i>FLO11(P)-CFP::LEU2</i>) wurde mit <i>Bst</i> EII verdaut und in YHUM2182 integriert. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels PCR und Southern-Hybridisierung mit einer <i>CFP</i> -spezifischen Sonde.	diese Arbeit
YHUM2193	YHUM43 mit <i>FLO11(P)-CFP::LEU2</i> BHUM1858 (<i>FLO11(P)-CFP::LEU2</i>) wurde mit <i>Bst</i> EII verdaut und in YHUM43 integriert. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels PCR und Southern-Hybridisierung mit einer <i>CFP</i> -spezifischen Sonde.	diese Arbeit
YHUM2194	YHUM1048 mit <i>FLO11(P)-CFP::LEU2</i> BHUM1858 (<i>FLO11(P)-CFP::LEU2</i>) wurde mit <i>Bst</i> EII verdaut und in YHUM1048 integriert. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels PCR und Southern-Hybridisierung mit einer <i>CFP</i> -spezifischen Sonde.	diese Arbeit
YHUM2195	YHUM2186 mit <i>URA3</i> YIplac211 (<i>URA3</i>) wurde mit <i>Eco</i> RV verdaut und in YHUM2186 integriert.	diese Arbeit
YHUM2196	YHUM2180 mit <i>FLO11(P)-CFP::LEU2</i> BHUM1858 (<i>FLO11(P)-CFP::LEU2</i>) wurde mit <i>Bst</i> EII verdaut und in YHUM2180 integriert. Die Verifikation der Insertion erfolgte mittels PCR und Southern-Hybridisierung mit einer <i>CFP</i> -spezifischen Sonde.	diese Arbeit
YHUM2197	YHUM2188 mit <i>URA3</i> YIplac211 (<i>URA3</i>) wurde mit <i>Eco</i> RV verdaut und in YHUM2188 integriert.	diese Arbeit
YHUM2198	YHUM2196 mit <i>URA3</i> YIplac211 (<i>URA3</i>) wurde mit <i>Eco</i> RV verdaut und in YHUM2196 integriert.	diese Arbeit

4.9.3 Plasmide

Tab. 4.9: Plasmide

Plasmid	Genotyp	Referenz
BHUM0029 (pME2071)	<i>GAL1(P)-TEC1</i> in pRS316	Mösch <i>et al.</i> , 1999
BHUM0030	<i>TEC1</i> in pRS202	Mösch & Fink, 1997
BHUM0164 (pME2051)	<i>TCS-CYC1-lacZ</i> in pLI4	Köhler <i>et al.</i> , 2002
BHUM0170 (B3782)	<i>FLO11(P)-lacZ</i> in YEplac355	Rupp <i>et al.</i> , 1999
BHUM0172	5× <i>TCS-CYC1-lacZ</i> in pLI4	Stammsammlung AG Mösch
BHUM0175	2× <i>TCS-CYC1-lacZ</i> in pLI4	Stammsammlung AG Mösch
BHUM0212	<i>FRE-CYC1-lacZ</i> in pL669-Z	Madhani & Fink, 1997
BHUM0565 (pME2068)	<i>TEC1(P)-TEC1</i> in YCplac33	Köhler <i>et al.</i> , 2002

Plasmid	Genotyp	Referenz
BHUM0697 (pME2289)	<i>TEC1(P)-TEC1</i> in YIplac111	Köhler <i>et al.</i> , 2002
BHUM0749	<i>B42-MSA2</i> ⁷⁹⁻³⁶³ in pJG4-5	Brückner, 2002
BHUM0752	<i>lexA-TEC1</i> ²⁸¹⁻⁴⁸⁶ in pEG202	Brückner <i>et al.</i> , 2011
BHUM0760 (pME2440)	<i>TEC1(P)-Myc3-TEC1</i> ¹⁻²⁸⁰ in YEplac181	Brückner <i>et al.</i> , 2004
BHUM0768	<i>TEC1(P)-Myc3-TEC1</i> in YEplac181	Brückner <i>et al.</i> , 2004
BHUM0769	<i>TEC1(P)-Myc3-TEC1</i> ²⁸⁰⁻⁴⁸⁶ in YEplac181	Brückner <i>et al.</i> , 2004
BHUM1176 (pME1108)	<i>CYCI(ΔUAS)-lacZ</i> in pLI4	Köhler <i>et al.</i> , 2002
BHUM1258	<i>URA3(P)-TEC1</i> in YIplac128	Heise <i>et al.</i> , 2010
BHUM1348	<i>URA3(P)-TEC1</i> ^{Bgl350Xho486} in YIplac128	van der Felden, 2008
BHUM1357	<i>URA3(P)-TEC1</i> ¹⁻²⁸⁰ - <i>STE12</i> ¹⁻⁶⁸⁸ :: <i>LEU2</i> in YIplac128	van der Felden, 2008
BHUM1358	<i>URA3(P)-TEC1</i> ¹⁻²⁸⁰ - <i>STE12</i> ¹⁻²⁵⁰ :: <i>LEU2</i> in YIplac128	van der Felden, 2008
BHUM1359	<i>URA3(P)-TEC1</i> ¹⁻²⁸⁰ - <i>STE12</i> ¹⁻⁴⁰⁰ :: <i>LEU2</i> in YIplac128	van der Felden, 2008
BHUM1360	<i>URA3(P)-TEC1</i> ¹⁻²⁸⁰ - <i>STE12</i> ³⁸⁰⁻⁶⁸⁸ :: <i>LEU2</i> in YIplac128	van der Felden, 2008
BHUM1363	<i>URA3(P)-TEC1</i> ¹⁻²⁸⁰ - <i>STE12</i> ¹⁻²⁵⁰ - <i>TEC1</i> ³⁷⁷⁻⁴⁸⁶ :: <i>LEU2</i> in YIplac128	van der Felden, 2008
BHUM1364	<i>URA3(P)-TEC1</i> ¹⁻²⁸⁰ - <i>STE12</i> ¹⁻⁴⁰⁰ - <i>TEC1</i> ³⁷⁷⁻⁴⁸⁶ :: <i>LEU2</i> in YIplac128	van der Felden, 2008
BHUM1464	<i>URA3(P)-TEC1</i> ¹⁻²⁸⁰ in YPlac211	van der Felden, 2008
BHUM1480	<i>TEC1(P)-TEC1</i> ^{LI46A} in YCplac111	Kern, 2011
BHUM1483	<i>TEC1(P)-TEC1</i> ^{SI87A} in YCplac111	Kern, 2011
BHUM1616	<i>TEC1(P)-TEC1</i> in YIplac128	Heise <i>et al.</i> , 2010
BHUM1639	<i>NotI Ubi-Y-Δk-CFP</i> in pNC955 In pNC955 wurde mittels sequenzspezifischer Mutagenese mit den Primern pNC955-NotI-fw und pNC955-NotI-rev eine <i>NotI</i> -Stelle direkt hinter dem Startcodon von <i>Ubi-Y-Δk-CFP</i> eingeführt.	Weisser, 2009
BHUM1640	<i>TCS-CYCI</i> in pJET1.2 <i>TCS-CYCI</i> (670 bp) wurde mit den Primern CYC1-Acc65I-fw und CYC1-NotI-rev aus BHUM164 amplifiziert und in pJET1.2 ligiert.	Weisser, 2009
BHUM1687	<i>lexA-TEC1</i> ³⁵⁰⁻⁴⁸⁶ in pEG202 <i>TEC1</i> ³⁵⁰⁻⁴⁸⁶ (408 bp) wurde mit <i>BglII/XhoI</i> aus BHUM1348 geschnitten und in pEG202 ligiert.	diese Arbeit
BHUM1696	<i>GALI(P)-MSA1-GST</i> in pGREG546 Erhalten durch <i>in-vivo</i> -Ligation, verwendete Primer: MSA1-rec1 und MSA1-rec2.	diese Arbeit
BHUM1697	<i>GALI(P)-MSA2-GST</i> in pGREG546 Erhalten durch <i>in-vivo</i> -Ligation, verwendete Primer: MSA2-rec1 und MSA2-rec2.	diese Arbeit
BHUM1702	<i>TCS-CYCI-CFP</i> in BHUM1639 <i>TCS-CYCI</i> (670 bp) wurde mit <i>Acc65I/NotI</i> aus BHUM1640 geschnitten und in BHUM1639 ligiert.	diese Arbeit
BHUM1703	<i>FRE-CYCI-CFP</i> in BHUM1639 <i>FRE-CYCI</i> (690 bp) wurde mit den Primern CYC1-Acc65I-fw und CYC1-NotI-rev aus BHUM212 amplifiziert, in pJET1.2 ligiert, mit <i>Acc65I/NotI</i> ausgeschnitten und in BHUM1639 kloniert.	diese Arbeit

Plasmid	Genotyp	Referenz
BHUM1704	<i>FLO11(P)-CFP</i> in BHUM1639 <i>FLO11(P)</i> (3 kb) wurde mit den Primern <i>FLO11-Acc65I-fw</i> und <i>FLO11-Acc65I-rev</i> aus BHUM170 amplifiziert, in pJET1.2 ligiert, mit <i>Acc65I/NotI</i> ausgeschnitten und in BHUM1639 kloniert.	diese Arbeit
BHUM1716	<i>TCS-CYC1-CFP-ADH1(T)</i> in YIplac128 <i>TCS-CYC1-CFP-ADH1(T)</i> (1,9 kb) wurde mit den Primern <i>CYC1-Acc65I-fw</i> und <i>pNC955-2308-EcoRI</i> aus BHUM1702 amplifiziert, in pJET1.2 ligiert, mit <i>Acc65I/EcoRI</i> ausgeschnitten und in YIplac128 kloniert.	diese Arbeit
BHUM1717	<i>FRE-CYC1-CFP-ADH1(T)</i> in YIplac128 <i>FRE-CYC1-CFP-ADH1(T)</i> (2 kb) wurde mit den Primern <i>CYC1-Acc65I-fw</i> und <i>pNC955-2308-EcoRI</i> aus BHUM1703 amplifiziert, in pJET1.2 ligiert, mit <i>Acc65I/EcoRI</i> ausgeschnitten und in YIplac128 kloniert.	diese Arbeit
BHUM1718	<i>FUS1(UAS)-CYC1-CFP-ADH1(T)</i> in YIplac128 <i>FUS1(UAS)-CYC1-CFP-ADH1(T)</i> (1,7 kb) wurde mit den Primern <i>FUS1-Acc65I-fw</i> und <i>pNC955-2308-EcoRI</i> aus pNC955 amplifiziert, in pJET1.2 ligiert, mit <i>Acc65I/EcoRI</i> ausgeschnitten und in YIplac128 kloniert.	diese Arbeit
BHUM1719	<i>RFP-ADH1(T)</i> in pJET1.2 <i>tagRFP-ADH1(T)</i> (905 bp) wurde mit den Primern <i>RFP-BcuI-fw</i> und <i>pNC955-2308-EcoRI</i> aus pDS1 amplifiziert und in pJET1.2 ligiert.	diese Arbeit
BHUM1720	<i>TCS-CYC1-CFP-ADH1(T)</i> in YIplac211 <i>TCS-CYC1-CFP-ADH1(T)</i> (1,9 kb) wurde mit den Primern <i>CYC1-Acc65I-fw</i> und <i>pNC955-2308-EcoRI</i> aus BHUM1702 amplifiziert, in pJET1.2 ligiert, mit <i>Acc65I/EcoRI</i> ausgeschnitten und in YIplac211 kloniert.	diese Arbeit
BHUM1721	<i>FRE-CYC1-CFP-ADH1(T)</i> in YIplac211 <i>FRE-CYC1-CFP-ADH1(T)</i> (2 kb) wurde mit den Primern <i>CYC1-Acc65I-fw</i> und <i>pNC955-2308-EcoRI</i> aus BHUM1703 amplifiziert, in pJET1.2 ligiert, mit <i>Acc65I/EcoRI</i> ausgeschnitten und in YIplac211 kloniert.	diese Arbeit
BHUM1722	<i>FUS1(UAS)-CYC1-CFP</i> in YIplac211 <i>FUS1(UAS)-CYC1-CFP-ADH(T)</i> (1,7 kb) wurde mit den Primern <i>FUS1-Acc65I-fw</i> und <i>pNC955-2308-EcoRI</i> aus pNC955 amplifiziert, in pJET1.2 ligiert, mit <i>Acc65I/EcoRI</i> ausgeschnitten und in YIplac211 kloniert.	diese Arbeit
BHUM1723	<i>TCS-CYC1-RFP-ADH(T)</i> in YIplac211 In BHUM1720 wurde mit sequenzspezifischer Mutagenese mit den Primern <i>dk-BcuI-fw</i> und <i>dk-BcuI-rev</i> <i>ACT</i> vor das erste Codon von <i>CFP (AGT)</i> eingesetzt, um eine <i>BcuI</i> -Stelle zu generieren. In einer weiteren PCR mit den Primern <i>UbiE-fw</i> und <i>UbiE-rev</i> wurde das N-Degron <i>UbiY</i> in <i>UbiE</i> umgewandelt, durch Ersetzen von <i>TAT</i> mit <i>GAA</i> . Dann wurde <i>RFP-ADH1(T)</i> (905 bp) aus BHUM1719 über <i>BcuI/EcoRI</i> -Stellen eingebracht.	diese Arbeit
BHUM1724	<i>FRE-CYC1-RFP-ADH(T)</i> in YIplac211 In BHUM1721 wurde mit sequenzspezifischer Mutagenese mit den Primern <i>dk-BcuI-fw</i> und <i>dk-BcuI-rev</i> <i>ACT</i> vor das erste Codon von <i>CFP (AGT)</i> eingesetzt, um eine <i>BcuI</i> -Stelle zu generieren. In einer weiteren PCR mit den Primern <i>UbiE-fw</i> und <i>UbiE-rev</i> wurde das N-Degron <i>UbiY</i> in <i>UbiE</i> umgewandelt, durch Ersetzen von <i>TAT</i> mit <i>GAA</i> . Dann wurde <i>RFP-ADH1(T)</i> (905 bp) aus BHUM1719 über <i>BcuI/EcoRI</i> -Stellen eingebracht.	diese Arbeit

Plasmid	Genotyp	Referenz
BHUM1725	<i>FUSI(UAS)-CYC1-RFP-ADH(T)</i> in YIplac211 In BHUM1722 wurde mit sequenzspezifischer Mutagenese mit den Primern dk-BcuI-fw und dk-BcuI-rev <i>ACT</i> vor das erste Codon von <i>CFP (AGT)</i> eingesetzt, um eine <i>BcuI</i> -Stelle zu generieren. In einer weiteren PCR mit den Primern UbiE-fw und UbiE-rev wurde das N-Degron <i>UbiY</i> in <i>UbiE</i> umgewandelt, durch Ersetzen von <i>TAT</i> mit <i>GAA</i> . Dann wurde <i>RFP-ADH1(T)</i> (905 bp) aus BHUM1719 über <i>BcuI/EcoRI</i> -Stellen eingebracht.	diese Arbeit
BHUM1754	<i>2×TCS-CYC1-CFP</i> in YIplac128 <i>2×TCS-CYC1</i> (690 bp) wurde mit den Primern CYC1-Acc65I-fw und CYC1-NotI-rev aus BHUM175 amplifiziert, in pJET1.2 ligiert, mit <i>Acc65I/NotI</i> ausgeschnitten und in BHUM1716 kloniert.	diese Arbeit
BHUM1755	<i>2×TCS-CYC1-RFP</i> in YIplac128 <i>2×TCS-CYC1</i> (690 bp) wurde mit den Primern CYC1-Acc65I-fw und CYC1-NotI-rev aus BHUM175 amplifiziert, in pJET1.2 ligiert, mit <i>Acc65I/NotI</i> ausgeschnitten und in BHUM1723 kloniert.	diese Arbeit
BHUM1759	<i>5×TCS-CYC1-CFP</i> in YIplac128 <i>5×TCS-CYC1</i> (800 bp) wurde mit den Primern CYC1-Acc65I-fw und CYC1-NotI-rev aus BHUM172 amplifiziert, in pJET1.2 ligiert, mit <i>Acc65I/NotI</i> ausgeschnitten und in BHUM1716 kloniert.	diese Arbeit
BHUM1773	<i>CYC1(ΔUAS)-CFP</i> in YIplac128 <i>CYC1(ΔUAS)-CFP</i> (650 bp) wurde mit den Primern CYC1-Acc65I-fw und CYC1-NotI-rev aus BHUM1176 amplifiziert, in pJET1.2 ligiert, mit <i>Acc65I/NotI</i> ausgeschnitten und in BHUM1716 kloniert.	diese Arbeit
BHUM1774	<i>CYC1(ΔUAS)-RFP</i> in YIplac128 <i>CYC1(ΔUAS)</i> (650 bp) wurde mit den Primern CYC1-Acc65I-fw und CYC1-NotI-rev aus BHUM1176 amplifiziert, in pJET1.2 ligiert, mit <i>Acc65I/NotI</i> ausgeschnitten und in BHUM1723 kloniert.	diese Arbeit
BHUM1810	<i>FRE-CYC1-BcuI⁺CFP</i> in YIplac211 In BHUM1721 wurde mittels sequenzspezifischer Mutagenese mit den Primern dk-BcuI-fw und dk-BcuI-rev <i>ACT</i> vor das erste Codon von <i>CFP (AGT)</i> eingeführt, um eine <i>BcuI</i> -Stelle zu generieren.	diese Arbeit
BHUM1811	<i>FUSI(UAS)-CYC1-BcuI⁺CFP</i> in YIplac211 In BHUM1722 wurde mittels sequenzspezifischer Mutagenese mit den Primern dk-BcuI-fw und dk-BcuI-rev <i>ACT</i> vor das erste Codon von <i>CFP (AGT)</i> eingeführt, um eine <i>BcuI</i> -Stelle zu generieren.	diese Arbeit
BHUM1858	<i>FLO11(P)-CFP</i> in YIplac128 <i>FLO11(P)</i> (3 kb) wurde mit <i>Acc65I/NotI</i> aus BHUM1704 geschnitten und in YHUM1754 kloniert.	diese Arbeit
BHUM1859	<i>FRE-CYC1-YFP-ADH1(T)</i> in YIplac211 <i>YFP-ADH1(T)</i> (0,9 kb) wurde mit den Primern YFP-BcuI-fw und pNC955-2308-EcoRI aus pCM29-1 amplifiziert, mit <i>BcuI/EcoRI</i> geschnitten und in BHUM1810 kloniert.	diese Arbeit
BHUM1860	<i>FUSI(UAS)-CYC1-YFP-ADH1(T)</i> in YIplac211 <i>YFP-ADH1(T)</i> (0,9 kb) wurde mit den Primern YFP-BcuI-fw und pNC955-2308-EcoRI aus pCM29-1 amplifiziert, mit <i>BcuI/EcoRI</i> geschnitten und in BHUM1811 kloniert.	diese Arbeit
BHUM1861	<i>CYC1(ΔUAS)-YFP-ADH1(T)</i> in YIplac211 <i>CYC1(ΔUAS)</i> (650 bp) wurde mit <i>Acc65I/NotI</i> aus BHUM1773 geschnitten und in BHUM1859 kloniert.	diese Arbeit

Plasmid	Genotyp	Referenz
BHUM1923	<i>TEC1(P)-TEC1^{I-280}</i> in YPlac211 In BHUM1616 wurde <i>TEC1-TEC1(T)</i> (2,1 kb) über <i>SalI/BamHI</i> -Stellen mit <i>TEC1^{I-280}-TEC1(T)</i> (1,45 kb) aus BHUM1464 ersetzt. Das resultierende <i>TEC1(P)-TEC1^{I-280}-TEC1(T)</i> -Fragment (2,5 kb) wurde dann über <i>PaeI/BamHI</i> -Stellen in YPlac211 kloniert.	diese Arbeit
BHUM1924	<i>URA3(P)-TEC1^{I-280}</i> in YPlac211 <i>URA3(P)-TEC1^{I-280}-TEC1(T)</i> (1,9 kb) wurde mit <i>PaeI/BamHI</i> aus BHUM1464 geschnitten und in YPlac211 kloniert.	diese Arbeit
BHUM1932	<i>MSA1</i> in pJET1.2 <i>MSA1</i> (1,9 kb) wurde mit den Primern <i>MSA1-fw-4-BamHI</i> und <i>MSA1-rev-1887-XhoI</i> aus genomischer DNA von YHUM1773 amplifiziert und in pJET1.2 ligiert.	diese Arbeit
BHUM1933	<i>MSA2</i> in pJET1.2 <i>MSA2</i> (1,1 kb) wurde mit Primern <i>MSA2-fw-4-BamHI</i> und <i>MSA2-rev-1089-XhoI</i> aus genomischer DNA von YHUM1773 amplifiziert und in pJET1.2 ligiert.	diese Arbeit
BHUM1935	<i>TEC1(P)-TEC1^{I-280}-MSA1</i> in YIplac211 <i>MSA1</i> (1,9 kb) wurde mit <i>BamHI/XhoI</i> aus BHUM1932 geschnitten und in BHUM1923 ligiert.	diese Arbeit
BHUM1936	<i>TEC1(P)-TEC1^{I-280}-MSA2</i> in YIplac211 <i>MSA2</i> (1,1 kb) wurde mit <i>BamHI/XhoI</i> aus BHUM1933 geschnitten und in BHUM1923 ligiert.	diese Arbeit
BHUM1937	<i>URA3(P)-TEC1^{I-280}-MSA1</i> in YIplac211 <i>MSA1</i> (1,9 kb) wurde mit <i>BamHI/XhoI</i> aus BHUM1932 geschnitten und in BHUM1924 ligiert.	diese Arbeit
BHUM1938	<i>URA3(P)-TEC1^{I-280}-MSA2</i> in YIplac211 <i>MSA1</i> (1,9 kb) wurde mit <i>BamHI/XhoI</i> aus BHUM1933 geschnitten und in BHUM1924 ligiert.	diese Arbeit
pCM29-1	Plasmid für die Herstellung von C-terminalen <i>YFP</i> -Kassetten, <i>HIS5</i> , <i>Amp^R</i>	zur Verfügung gestellt von M. Knop
pDS1	<i>tagRFP::kanMX</i> , <i>Amp^R</i>	Stammsammlung AG Taxis
pEG202	<i>HIS3</i> -basierter 2 μ m-Vektor für die Herstellung von <i>lexA</i> -Fusionsgenen, <i>Amp^R</i>	Golemis & Brent, 1992
pFA6a-hphNT1	Plasmid für die Herstellung von Gendeletionskassetten, <i>hphNT1</i> , <i>Amp^R</i>	Janke <i>et al.</i> , 2004
pFA6a-natNT2	Plasmid für die Herstellung von Gendeletionskassetten, <i>natNT2</i> , <i>Amp^R</i>	Janke <i>et al.</i> , 2004
pGREG546	<i>GAL1(P)-GST</i> , <i>URA3</i> -basierter <i>CEN</i> -Vektor für die Konstruktion N-terminaler Fusionsgene, <i>Amp^R</i>	Jansen <i>et al.</i> , 2005
pJET1.2 (BHUM1424)	<i>eco471R</i> -basierter Suizidvektor, <i>Amp^R</i>	FERMENTAS
pJG4-5	<i>TRP1</i> -basierter 2 μ m-Vektor für die Herstellung von <i>B42</i> -Fusionsgenen, <i>Amp^R</i>	Golemis & Brent, 1992
pLG669-Z (BHUM975)	<i>URA3</i> -basiertes 2 μ m- <i>lacZ</i> -Reporterplasmid, <i>Amp^R</i>	Guarente & Ptashne, 1981
pLI4 (BHUM132)	<i>CYC1-lacZ</i> in <i>URA3</i> -basierten integrativem Vektor, <i>Amp^R</i>	Köhler <i>et al.</i> , 2002
pNC955	<i>FUS1(UAS)-CYC1-Ubi-Y-Ak-CFP</i> in pUC118	Hackett <i>et al.</i> , 2006
pRS202	<i>URA3</i> -basierter 2 μ m-Vektor, <i>Amp^R</i>	Sikorski & Hieter, 1989

Plasmid	Genotyp	Referenz
pRS304	<i>TRP1</i> -basierter integrativer Vektor, <i>Amp^R</i>	Sikorski & Hieter, 1989
pUC118	pUC-verwandter Klonierungsvektor, <i>Amp^R</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pYGEX-2T	<i>GAL1(P)</i> - <i>GST</i> , <i>URA3</i> -basierter 2 μ m -Vektor, <i>Amp^R</i>	Schlenstedt <i>et al.</i> , 1995
pYM20	Plasmid für die Herstellung von C-terminalen <i>Myc⁹</i> -Kassetten, <i>hphNT1</i> , <i>Amp^R</i>	Janke <i>et al.</i> , 2004
pYM4	Plasmid für die Herstellung von C-terminalen <i>Myc³</i> -Kassetten, <i>kanMX6</i> , <i>Amp^R</i>	Knop <i>et al.</i> , 1999
pYM7	Plasmid für die Herstellung von C-terminalen <i>ProA</i> -Kassetten, <i>kanMX6</i> , <i>Amp^R</i>	Knop <i>et al.</i> , 1999
YCplac111	<i>LEU2</i> -basierter CEN-Vektor, <i>Amp^R</i>	Gietz & Sugino, 1988
YCplac33	<i>URA3</i> -basierter CEN-Vektor, <i>Amp^R</i>	Gietz & Sugino, 1988
YEp355	<i>URA3</i> -basierter 2 μ m-Vektor, <i>Amp^R</i>	Myers <i>et al.</i> , 1986
YEplac181	<i>LEU2</i> -basierter 2 μ m-Vektor, <i>Amp^R</i>	Gietz & Sugino, 1988
YEplac195	<i>URA3</i> -basierter 2 μ m-Vektor, <i>Amp^R</i>	Gietz & Sugino, 1988
YIplac128	<i>LEU2</i> -basierter integrativer Vektor, <i>Amp^R</i>	Gietz & Sugino, 1988
YIplac211	<i>URA3</i> -basierter integrativer Vektor, <i>Amp^R</i>	Gietz & Sugino, 1988

4.10 Oligonukleotide

Tab. 10: Oligonukleotide

Name	Sequenz 5' - 3'	Verwendung
AGA1-RT-fw-2019-2039	CACTACAGAAGTTTCCACTAC	Quantitative Realtime-PCR Produktgröße: 121 bp
AGA1-RT-rev-2140-2120	CGAAGACCAACTTTCCTAATG	
BHBURA3-3	CTGACATTGGTAATACAGTCAAATTG	<i>URA3</i> -Sonde (450 bp) aus genomischer DNA für die Southern-Hybridisierung
BHBURA3-4	GTAACGTTACCCCTCTACCTTAG	
CDC28-RT-fw-743-761	GCTTTCCTCAATGGCGCAG	Quantitative Realtime-PCR Produktgröße: 115 bp
CDC28-RT-rev-858-839	GGCGCTAATCCGGTTAATAG	
CFP-Sonfor	ATGCAACATACGGAAACTTAC	<i>CFP</i> -Sonde (600 bp) aus pNC955 für die Southern- Hybridisierung
CFP-Sonrev	GTATAGTTCATCCATGCCATG	
CLN2-ChIP-fw	TTTACCCGGCTCCATCTTTC	ChIP Produktgröße: 255 bp
CLN2-ChIP-rev	AGTAGGCCTGTCAGATCAAC	

Name	Sequenz 5' - 3'	Verwendung
CYC1-Acc65I-fw	GCGGCGGGTACCACATGGTCTACCTT TGATGAC	Amplifizierung des <i>CYC1(P)</i> - Fragments aus <i>CYC1-lacZ</i> - Konstrukten, generieren 3'- <i>Acc65I</i> - und 5'- <i>NotI</i> -Stellen
CYC1-NotI-rev	GGGCCCCGCGGCCGCATCCGGTCATT ATTAATTTAGTG	
CYC1-SEQ1-fw- 76	ATACATTAGGACCTTTGCAGC	Sequenzierung von <i>CYC1(P)</i>
CYC1-SEQ2-fw- 311	CAAGGTAAGGGAACATAAAGTGTA	
DDR48-RT-fw- 1128-1148	CAACAATGACTCTTACGGTTC	Quantitative Realtime-PCR Produktgröße: 119 bp
DDR48-RT-rev- 1247-1224	TGAACCATAAGAGTCATCATTG	
DIG1-S2	GAGTGTATGCGAGTGTATGTAAGTTT ATAAGTGCCTGTGTGGCTACTAATCG ATGAATTCGAGCTCG	endogene C-terminale Markierung
DIG1-S3	AAGGAGCTGACAAAAAATCATCAT CACATCACAGAACCGGAAAACGTAC GCTGCAGGTCGAC	
DIG1-Tag	GGCATGAGGCAGAACCCAA	Überprüfung C-terminaler Markierung
DIG2-S2	GAGTTTTAGGTGCATTCTATAGCGTG AAGAAGTGAAATCTCGTCAATCGAT GAATTCGAGCTCG	endogene C-terminale Markierung
DIG2-S3	AAAGCATGTGAAACAATCTGGACTG AATGGCATAACTTGAAGAAACGTAC GCTGCAGGTCGACCGCTGCAGGTCG AC	
DIG2-Tag	CCACACTTGGAAGATTTGACAT	Überprüfung C-terminaler Markierung
dk-BcuI-fw	CACCCTGGCgccaatacgACTAGTAAAG GAGAAGAAC	Sequenzspezifische Mutagenese, generieren durch Einsetzen von ACT eine <i>BcuI</i> -Schnittstelle vor dem <i>CFP</i> -ORF
dk-BcuI-rev	GAAAAGTTCTTCTCCTTTACTAGTcgta ttgggcGCCAGG	
FLO11-Acc65I-fw	GCGGCGGGTACCTCTCTTCTCCACAT ACCAATCAC	Amplifizierung von <i>FLO11(P)</i> (2980 bp) aus BHUM170, generieren 3'- <i>Acc65I</i> - und 5'- <i>NotI</i> -Stellen
FLO11-NotI-rev	GGGCCCCGCGGCCGCTAGAGGGTCTT TGCATAGTGTG	
FLO11-ChIP-fw	GACCGCTGAGCAATTTAAAGC	ChIP Produktgröße: 268 bp
FLO11-ChIP-rev	GAGCGCAGTAACGTAAATGC	
FLO11-RT-fw- 3939-3958	CGTTGTCACATCTCCATCTC	Quantitative Realtime-PCR Produktgröße: 118 bp
FLO11-RT-rev- 4057-4037	GAACCTTGATATTAGCAGCAC	
FUS1-Acc65I	GCGGCGGGTACCCCCCTCGAGTG	Amplifizierung von <i>FUS1(UAS)</i> , generiert 3'- <i>Acc65I</i> -Stelle
FUS1-ChIP-fw	GTTGTCAGTGATGCCTCAATC	ChIP Produktgröße: 251 bp
FUS1-ChIP-rev	CATACCTTACAAAGCCACTC	
hiskantag2	GCTGCGCACGTCAAGACTG	Überprüfung von endogenen Markierungen und Deletionen
HXK1-RT-fw- 1291-1309	GCCGCTAAGGGTTTGAGAG	Quantitative Realtime-PCR Produktgröße: 118 bp
HXK1-RT-rev- 1409-1389	GACAATGCAGCAATAACAGCA	

Name	Sequenz 5' - 3'	Verwendung
MBP1-S2	TTTCAGTATATGGATACATGTAAAGT TCCTCTATTTATGTATATTTTAATCG ATGAATTCGAGCTCG	endogene C-terminale Markierung
MBP1-S3	GGCGCAGAACAGATCATCACAATCT CAAACGCGAATAGTCATGCACGTAC GCTGCAGGTCGAC	
MBP1-Tag	CTACCACCAATAACACAGTTG	Überprüfung C-terminaler Markierung
MSA1-fw-4- BamHI	GCGGCGGGATCCGATAAAAGCATGA TCAAAAAAAG	Zur Amplifizierung von <i>MSA1</i> , generiert <i>Bam</i> HI-Stelle direkt nach dem Startcodon und <i>Xho</i> I- Stelle direkt vor dem Stopcodon
MSA1-rev-1887- XhoI	GCGGCGCTCGAGCTGATCATCGATT AATCTTTTC	
MSA1-rec1	GAATTCGATATCAAGCTTATCGATAC CGTCGACAATGGATAAAAGCATGAT CAA	<i>in-vivo</i> -Ligation in pGREG546
MSA1-rec2	GCGTGACATAACTAATTACATGACTC GAGGTCGACTCACTGATCATCGATTA ATCT	
MSA1-S1	GAATAAAAATATCTCAAGAATACTT CGTGAAAAATATTCATATGCGTAC GCTGCAGGTCGAC	Deletion
MSA1-S2	GTCCTTTTGGCTCATATCGTTTTTCAT GAATCTATGACTATTTTCAATCGATG AATTCGAGCTCG	endogene C-terminale Markierung und Deletion
MSA1-S3	CAGGATGATGCTAGAACTGCCTTGA AAAGATTAATCGATGATCAGCGTAC GCTGCAGGTCGAC	endogene C-terminale Markierung
MSA1-KO	ACACAATCGTTGAGGATGCG	Überprüfung Deletion
MSA1-Tag	CACAACAGGGGTAGCAAATAT	Überprüfung C-terminaler Markierung
MSA1-SEQ-842	CAAAGAGTTCTCTACAATTCAG	Zur Sequenzierung von <i>MSA1</i> (Σ1278b) in Richtung Stopcodon
MSA1-SEQ-fw- 605	GAAGAGACGTATTCTTTCTCTC	
MSA2-fw-4- BamHI	GCGGCGGGATCCGTATACACAACAC CGCAACAAC	Zur Amplifizierung von <i>MSA1</i> , generiert <i>Bam</i> HI-Stelle direkt nach dem Startcodon und <i>Xho</i> I- Stelle direkt vor dem Stopcodon
MSA2-rev-1089- XhoI	GCGGCGCTCGAGCTCTCTGGAGACA AGTTTTTCG	
MSA2-rec1	GAATTCGATATCAAGCTTATCGATAC CGTCGACAATGGTATACACAACACC GCAA	<i>In-vivo</i> -Ligation in pGREG546
MSA2-rec1	GAATTCGATATCAAGCTTATCGATAC CGTCGACAATGGTATACACAACACC GCAA	
MSA2-S1	TTACAAAAGATTTTAGCAAGGAAGC AGTTTTTAAACCAATCAATGCGTACG CTGCAGGTCGAC	Deletion
MSA2-S2	AATGAAATCTTACGTAGTGTATTTTA CGAAAACCAATGGACCTAATCGAT GAATTCGAGCTCG	endogene C-terminale Markierung und Deletion
MSA2-S3	AAAGATGATGCCACAATGGCACTAC GAAACTTGTCTCCAGAGAGCGTAC GCTGCAGGTCGAC	endogene C-terminale Markierung
MSA2-KO	TACCGTCATAAGATTCGATCC	Überprüfung Deletion

Name	Sequenz 5' - 3'	Verwendung
MSA2-Tag	GATTAATAGATCCCCTTCCCA	Überprüfung C-terminaler Markierung
MSB2-ChIP-rev	ACGTGTCTAGCCACTTGCTG	ChIP
MSB2-ChIP-rev	ACGTGTCTAGCCACTTGCTG	Produktgröße: 282 bp
PGU1-RT-fw-924-944	AGTAATGAAGGATATCACCGG	Quantitative Realtime-PCR Produktgröße: 104 bp
PGU1-RT-rev-1028-1010	CCGGTAATTGACACCCCAG	
pNC955-2308-EcoRI	GGGCCCCGAATTCGGTGTGGTCAATA AGAGCGAC	<i>ADH1(T)</i> -spezifischer Rückwärts-Primer
pNC955-NotI-fw	AACATAATAGATTATGGCGGCCGCCC AGATTTTCGTCAAG	Sequenzspezifische Mutagenese, generieren <i>NotI</i> -Schnittstelle + <i>C</i> vor <i>CFP</i>
pNC955-NotI-rev	CTTGACGAAAATCTGGCGGCCGCCC ATAATCTATTAGTT	
PRM5-RT-fw-816-836	GCTGCTTAATTCACCAGAAAG	Quantitative Realtime-PCR Produktgröße: 114 bp
PRM5-RT-rev-930-911	CATGTGCTCGAGATAAGTCG	
RFP-BcuI-fw	GCGGCGACTAGTTCTGAATTAATTAA AGAAAATATGCATATG	Amplifizierung von <i>tagRFP</i> aus pDS1, generiert 3'- <i>BcuI</i> -Stelle
RFP-Sonfor	GAAATTATATATGGAAGGTACAG	<i>RFP</i> -Sonde (600 bp) aus pDS1 für die Southern-Hybridisierung
RFP-Sonrev	GATGGTAAATCACAATATCTAG	
SRD1-RT-fw-542-560	GTGGACCCGACCAAAACAG	Quantitative Realtime-PCR Produktgröße: 102 bp
SRD1-RT-rev-644-624	CTTTTATCTGCTGCTTGCCTT	
SRL3-ChIP-fw	CGAGGCTCATCAACTTCAAC	ChIP
SRL3-ChIP-rev	AGCCTTTAATGCACCGGTAC	Produktgröße: 327 bp
STE12-S2	CATTTTAAATTCTTGTATCATAAATT CAAAAATTATATTATATCAATCGATG AATTCGAGCTCG	endogene C-terminale Markierung
STE12-S3	GTAGATACCAATCGAAGGTCCGATA AAAACCTTCCAGATGCAACCCGTAC GCTGCAGGTCGAC	
STE12-Tag	CACAAGGAAATGTTCCAACAG	Überprüfung C-terminaler Markierung
STE7-S1	GATCATATCTGTTTTTGCAGCGTGGT ATATTGGTTGTTGGTCATGCGTACGC TGCAGGTCGAC	Deletion
STE7-S2	GAAAAAAAGTGCAATATGTTTCCTAA CTAATGTTATCGCATGCATTCAATCG ATGAATTCGAGCTCG	
STE7-KO	AATGTACAATCAGATAATAAACAC	Überprüfung Deletion
SWI4-S2	TGATAATATAGTAAAAATTATTGGTA CATTGTGAATTAATAATTAATCGATG AATTCGAGCTCG	endogene C-terminale Markierung
SWI4-S3	GACTCAAATTGGACGATATAGAAA AGGATTTGAGGGCAAACGCACGTAC GCTGCAGGTCGAC	
SWI4-Tag	CAATTCCAAAGTCAACGTCG	Überprüfung C-terminaler Markierung
TEC1-ChIP-fw	CCATTAGTGACACAGGTGAG	ChIP
TEC1-ChIP-rev	GGATTGCTGATGGTAGCTAC	Produktgröße: 283 bp

Name	Sequenz 5'-3'	Verwendung
TEC1-SEQ1	GACTGAAGGTAGAGAGTC	TEC1-Sonde (630 bp) aus BHUM565 für die Southern-Hybridisierung
TEC1-NSonrev	GTATTCACAGTCGGCCTTG	
TEC1-S1	GAATAATCCACCTATTTCAACAATTC TGATACCTGTTTAACCATGCGTACGC TGCAGGTCGAC	Deletion
TEC1-S2	TATGCGTATTTATGTACGAGATGTAT GTATGTATGTAGACATTTAATCGATG AATTCGAGCTCG	endogene C-terminale Markierung und Deletion
TEC1-S3	CAAAGGAACCTTACGCCATCCAACC AATCGCATGGGAACCTTTATCGTACG CTGCAGGTCGAC	endogene C-terminale Markierung
TEC1-KO	GCTCATGCACAGTTAAAAAGC	Überprüfung Deletion
TEC1-Tag	AGTAATCCTGAGTTCAGTTCC	Überprüfung C-terminaler Markierung
TRA1-ChIP-fw	GTGATCACGTGGTCAGACAG	ChIP Produktgröße: 126 bp
TRA1-ChIP-rev	CGTGTGATACCTCCGATTTTG	
UbiE-fw	GTGCTAAGGCTAAGAGGTGGTGAAC ACGGATCCGGAGCT	Sequenzspezifische Mutagenese, ersetzen <i>UbiY</i> (<i>TAT</i>) durch <i>UbiE</i> (<i>GAA</i>)
UbiE-rev	CAGCCAAGCTCCGGATCCGTGTTTAC CACCTCTTAGCCT	
Ubi-SEQ1-fw	GTAGAACGCTGTCTGATTACAAC	Sequenzierung von <i>UbiE</i>
YFP-BcuI-fw	GCGGCGACTAGTTCTAAAGGTGAAG AATTATTCAGT	Amplifizierung von <i>Citrine</i> (<i>YFP</i>) aus pCM29-1, generiert 3'- <i>BcuI</i> -Stelle
YFP-Sonfor	GTGATGCTACTTACGGTAAATTG	YFP-Sonde (600 bp) aus pCM29 für die Southern-Hybridisierung
YFP-Sonrev	CATACCATGGGTAATACCAGC	
YLR042C-RT-fw-306-326	CTCAAATTCTACGGTAGTCAC	Quantitative Realtime-PCR Produktgröße: 119 bp
YLR042C-RT-rev-425-407	GAACCTACACCTCCTGTGC	

5 Methoden

5.1 Kultivierung von Mikroorganismen

5.1.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

E. coli-Zellen wurden in LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika zur Plasmidselektion bei 37 °C kultiviert. Das Wachstum wurde durch Messung der OD_{600nm} verfolgt. Dabei entspricht eine OD_{600nm} = 1 einer Zelldichte von rund 2×10^8 Zellen/ml (Sherman *et al.*, 1986). Für Dauerkulturen wurden 900 µl einer Übernachtskultur mit 30%igem Glycerin gemischt und bei –70 °C eingefroren.

5.1.2 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae-Zellen wurden in YPD-, SC- oder LF-Medium bei 30 °C kultiviert. Zur Selektion auf Auxotrophien wurde SC-Medium ohne die entsprechenden Supplemente (Histidin, Leucin, Tryptophan und Uracil) verwendet. Das Wachstum der Hefezellen wurde durch Messung der OD_{600nm} verfolgt. Eine OD_{600nm} = 1 entspricht dabei einer Zelldichte von rund $1,5 \times 10^7$ Zellen/ml (Sherman *et al.*, 1986). Für Dauerkulturen wurden die Hefezellen zunächst für 2 Tage auf YPD- oder SC-Agarplatten inkubiert, mit Hilfe einer sterilen Impföse abgekratzt und in 1,8 ml einer 15%igen Glycerin-Lösung bei –70 °C gelagert.

5.2 Isolierung von DNA

5.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*: "STET-Prep" (Holmes & Quigley, 1981)

1,5 ml einer Übernachtskultur wurden in einer Laborzentrifuge für 1 min bei 13.000 rpm sedimentiert und in 400 µl STET-Puffer (8 % (w/v) Saccharose, 0,5 % (v/v) Triton X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8,0) resuspendiert. Nach Zusatz von 25 µl Lysozym (12 mg/ml) wurden die Zellen für 1 min in kochendem Wasser aufgeschlossen und Zelltrümmer mit 13.000 rpm bei 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde mit einem sterilen Zahnstocher aus dem Reaktionsgefäß

entfernt. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 50 µl 3 M Na-Acetat-Lösung (pH 4,8) und 500 µl Isopropanol nach Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm und 4 °C gefällt. Das Pellet wurde mit 70%igem EtOH gewaschen, getrocknet und anschließend in 50 µl TE-Puffer (1 mM EDTA, 10 mM Tris pH 8,0) aufgenommen. Die isolierte Plasmid-DNA wurde bei –20 °C aufbewahrt.

Alternativ wurde Plasmid-DNA aus 3-5 ml Übernachtskultur mit Hilfe des "Plasmid Mini Prep Kit" (METABION) oder des Miniprep Kits "QIAprep Spin" (QIAGEN) nach Herstellerangaben isoliert und in 35-50 µl Elutionspuffer aufgenommen. Die Konzentration der DNA-Lösung wurde mit dem Spektralphotometer "NanoDrop® ND-1000" (THERMO FISHER SCIENTIFIC) bei 260 nm Wellenlänge bestimmt.

5.2.2 Isolierung von genomischer DNA aus *S. cerevisiae*: "Smash'n'Grab" (Hoffman & Winston, 1987)

10 ml-Hefekulturen wurden in YPD-Medium bei 30 °C über Nacht angezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 3.000 rpm geerntet, mit 500 µl dH₂O gewaschen und anschließend in 200 µl Lysepuffer (2 % (w/v) Triton X-100, 1 % (w/v) SDS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris pH 8,0) aufgenommen. Nach Zugabe von 250 µl Glasperlen (Ø 0,25-0,50 mm) und 200 µl einer TE-gesättigten Roti®-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (Verhältnis 25:24:1) (CARL ROTH) wurden die Zellen durch 5-minütiges Schütteln auf einem "Vibrax Basic"-Multivortexer (IKA) aufgebrochen. Zelltrümmer wurden für 5 min bei 13.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die im Überstand enthaltene DNA nach Zugabe von 1 ml eiskaltem 100%igen EtOH für 5 min bei 13.000 rpm präzipitiert. Nach dem Lösen in 400 µl TE-Puffer erfolgte ein 30-minütiger RNA-Verdau bei 37 °C mit 3 µl RNase A (10 mg/ml). Anschließend fand eine erneute Fällung der DNA mit 1 ml eiskaltem 100%igen Ethanol und Zentrifugation bei 13.000 rpm für 5 min statt. Das luftgetrocknete Pellet wurde in 50 µl TE-Puffer aufgenommen und bei –20 °C aufbewahrt. Die DNA wurde in dieser Form für Restriktionen für Southern-Hybridisierungen und als PCR-Matrize eingesetzt.

5.2.3 Isolierung von Plasmiden aus *S. cerevisiae* (modifiziert nach Robzyk & Kassir, 1992)

Um Plasmide aus *S. cerevisiae* zu isolieren, die mittels "Drag and Drop Cloning" hergestellt wurden (Abschnitt 5.8.3), wurden Zellen einer Einzelkolonie über Nacht in SC-Medium angezogen und je 2 ml der Kulturen wurden für 2 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen mit 200 µl STET-Puffer (Abschnitt 5.2.1) und 200 µl Glasperlen (\varnothing 0,25-0,50 mm) für 5 min auf dem Multivortexer bei 4 °C aufgebrochen. Weitere 100 µl STET-Puffer wurden zugegeben, die Ansätze wurden für 3 min im Wasserbad aufgekocht und wieder auf Eis abgekühlt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 13.000 rpm und 4 °C. 100 µl des Überstandes wurden mit 50 µl 5 M Ammoniumacetat gemischt und für mindestens 20 min bei –20 °C inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm und 4 °C wurden 100 µl des Überstandes mit 200 µl eiskaltem 100%igen EtOH gemischt und wieder zentrifugiert (15 min bei 13.000 rpm und 4 °C). Das Pellet wurde mit 70%igem EtOH gewaschen und in 50 µl 10 mM Tris pH 7,5 gelöst. Anschließend wurden die Ansätze mit Hilfe des Gelextraktions-Kits "QIAquick" (QIAGEN) weiter gereinigt, die DNA wurde in 30 µl EB eluiert. Hiervon wurden je 6 µl für eine *E. coli*-Transformation eingesetzt.

5.3 Klonierungstechniken und Mutagenese von DNA

5.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1985)

Für die PCR wurden die hitzestabilen Enzyme KOD-, Pfu-, Phusion- oder Taq-Polymerase (Tab. 4.2) verwendet. Primer wurden in Konzentrationen von 10-20 pmol eingesetzt und zusammen mit 50-100 ng Matrizen-DNA in 30-100 µl Reaktionsvolumen entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Art und Dauer des Temperaturprofils richteten sich nach den Herstellerangaben, den verwendeten Primern und der Matrice.

5.3.2 Sequenzspezifische Mutagenese (Weiner *et al.*, 1994)

Für die Einführung von Restriktionsschnittstellen und Punktmutationen wurden PCR-Primer synthetisiert, in deren Mitte die Mutation liegt und die jeweils 15 bp

flankierende Sequenzen tragen, die homolog zur Matrize waren. In den 25 Zyklen der folgenden PCR wurde das Plasmid vollständig amplifiziert. Methylierte Matrizen-DNA im PCR-Ansatz wurde mit dem Restriktionsenzym *DpnI* geschnitten. Das Amplifikat mit der Mutation wurde dann einer Ligationsreaktion unterzogen und in *E. coli* transformiert. Das Plasmid wurde wieder isoliert und zur Überprüfung sequenziert.

5.3.3 Restriktion von DNA

Für analytische Restriktionsreaktionen wurden 2-3 µl DNA aus einer "STET-Prep" mit 1-2 Einheiten Restriktionsenzym (FERMENTAS) in Volumina von 10-30 µl bei 37 °C für 2 h inkubiert. Für die Restriktion präparativer DNA-Mengen aus "Mini-Preps" mit Hilfe von Kits wurden entsprechend größere Volumina und Enzymmengen eingesetzt. Reaktionspuffer wurden nach den Angaben des Herstellers verwendet. Gegebenenfalls wurde die DNA aus den Restriktionsansätzen mittels einer Ethanol-Fällung und Aufnahme in 10 mM Tris pH 8,5 gereinigt.

5.3.4 Gelelektrophorese von DNA in Agarosegelen

Die DNA wurde vor dem Auftragen mit 1/6 Vol DNA-Auftragspuffer (60 % (v/v) Glycerin, 0,03 % (w/v) Bromphenolblau, 0,03 % (w/v) Xylencyanol FF, 60 mM EDTA, 10 mM Tris pH 7,5) versetzt und in 1–2%igen Agarosegelen in TAE (40 mM Tris-Base, 20 mM Na-Acetat, 2 mM EDTA, pH 8,3) bei 80-130 V Gleichspannung für 30-60 min aufgetrennt. Danach wurde das Gel für 10-20 min in eine Ethidiumbromid-Färbelösung (0,5 µg/ml in H₂O) gelegt und anschließend zur Kontrasterhöhung für 10 min in einem Wasserbad inkubiert. Die DNA konnte dann durch Bestrahlung mit UV-Licht bei 254 nm Wellenlänge mittels eines UV-Transilluminators bzw. durch die Geldokumentationsanlage "GelDoc XR" (BIO-RAD) sichtbar gemacht werden. Als Größenstandard diente der „GeneRuler™ DNA Ladder Mix“ (FERMENTAS).

5.3.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden aus Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegelen auf einem UV-Transilluminator mit Hilfe eines Spatels ausgeschnitten und nach Vorschriften der Gelextraktions-Kits "E.Z.N.A" (VWR) oder "QIAquick" (QIAGEN) isoliert.

5.3.6 Dephosphorylierung von DNA (Gannon & Powell, 1991)

Für die Dephosphorylierung wurde linearisierte DNA mit "Shrimp alkalischer Phosphatase" (ROCHE) im entsprechenden Puffer bei 37 °C für 30 min bis 2 Stunden inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Erhitzen des Ansatzes auf 65 °C für 15 min gestoppt.

5.3.7 Ligation von DNA (nach Maniatis *et al.*, 1982)

Linearisierte DNA-Fragmente wurden im Verhältnis von 1:5 bis 1:10 (Vektor-DNA:Insert-DNA in ng) in einem Reaktionsgemisch aus 1/10 Vol Reaktionspuffer, 2 µl "T4 DNA-Ligase" (ROCHE) und 30 mM ATP für 4 h bei Raumtemperatur, für 16 h bei 16 °C oder für 2 Tage bei 4 °C inkubiert. Für "blunt end"-Ligationen wurden 5 % PEG-4000 zugesetzt. Die Ligationsreaktion wurde durch Erhitzen des Ansatzes auf 65 °C für 10 min gestoppt.

5.3.8 "Drag and Drop cloning": *S. cerevisiae in-vivo*-Ligation (Jansen *et al.*, 2005)

Zur Herstellung der Plasmide BHUM1696 und BHUM1697 wurde die in Jansen *et al.*, 2005 beschriebene Methode verwendet.

5.3.9 Fällung von DNA mit Ethanol

Zur Fällung von DNA in Lösung wurde 1/10 Vol Natriumacetat pH 4,8 und 2,5 Vol eiskaltes EtOH zugegeben, gemischt und für mindestens 10 min bei –20 °C inkubiert. Anschließend folgten die Zentrifugation für mindestens 5 min bei 13.000 rpm und ein Waschschrift mit 180 µl 70%igem EtOH. Die gefällte und gereinigte DNA wurde dann auf einem Heizblock bei 37 °C bis 65 °C getrocknet und in 10 mM Tris pH 8,5 bei 65 °C gelöst.

5.4 Transformationsmethoden

5.4.1 Transformation von *E. coli* (modifiziert nach Mandel & Higa, 1992)

5.4.1.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

250 ml SOB-Medium wurden mit Zellen des gewünschten *E. coli*-Stamms beimpft und bei RT inkubiert, bis eine $OD_{600nm} = 0,6$ erreicht war. Zur Ernte wurden die Zellen 10 min auf Eis gekühlt und dann für 10 min bei 3.000 rpm bei 4 °C abzentrifugiert. Nach Zugabe von 20 ml TB-Puffer (10 mM HEPES, 15 mM $CaCl_2$, 250 mM KCl, 55 mM $MnCl_2$, pH 6,7) wurden die Zellen vorsichtig resuspendiert mit DMSO versetzt (Endkonzentration 7 % (w/v)) und erneut 10 min auf Eis inkubiert. Dann wurde der Ansatz in 100- μ l-Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –70 °C bis zur Transformation gelagert.

5.4.1.2 Transformation von *E. coli*

Eingefrorene Aliquots mit kompetenten *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit der gewünschten Menge Plasmid-DNA (0,5-10 μ l) versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 60 s bei 42 °C und die Abkühlung der Ansätze für 1-2 min auf Eis. Den Transformationsansätzen wurden dann 800 μ l SOC-Medium zugefügt und die Zellen wurden zur Erholung für 30-60 min bei 37 °C inkubiert. Dann wurden die Zellen auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C stehen gelassen.

5.4.2 Transformation von *S. cerevisiae* (modifiziert nach Ito *et al.*, 1983; Knop *et al.*, 1999)

Zur Herstellung kompetenter Hefezellen wurden 50-100 ml YPD-Medium aus einer 10-ml-Übernachtskultur auf eine $OD_{600nm} = 0,3$ angeimpft und bei 30 °C inkubiert, bis eine $OD_{600nm} = 0,8-1$ erreicht war. Die Zellen wurden dann bei 2.000 rpm für 3 min abzentrifugiert und nach Entfernen des Überstandes mit 10 ml SORB (100 mM Li-Acetat, 10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA, 1 M Sorbitol, pH 8,0) gewaschen und in 360 μ l SORB aufgenommen. Den *S. cerevisiae*-Zellen wurden 40 μ l frisch denaturierte Heringsspermien-DNA (10 mg/ml) zugesetzt. Die kompetenten Zellen wurden entweder direkt zur Transformation eingesetzt oder in 150- μ l-Aliquots aufgeteilt und bei –70 °C eingefroren. Für eine integrative Transformation wurden 30-50 μ l DNA-Lösung zu 80-

150 µl kompetenten Hefezellen gegeben, für eine episomale Transformation wurden 2-20 µl Plasmid-DNA zu 20-80 µl kompetenten Hefezellen hinzugefügt. Die Transformationsansätze wurden mit 5 Vol 50 % PEG-3350/SORB vermischt und für 30-60 min bei 30 °C stehend inkubiert. Es folgte ein 10minütiger Hitzeschock bei 42 °C. Die Zellen wurden anschließend in 1 ml YPD gewaschen (2 min 2.000 rpm) und in 1 ml YPD für 1-16 h bei 30 °C schüttelnd inkubiert, bis die gewünschte metabolische Prototrophie oder Antibiotika-Resistenz ausgebildet war. Die Zellen wurden dann auf Agarplatten mit Selektionsmedium plattiert und bei 30 °C für 3-4 Tage inkubiert.

5.5 Analyse von DNA

5.5.1 Nachweis von DNA: "Southern-Hybridisierung" (Southern, 1975)

Um die korrekte Insertion von integrativen Plasmiden ins *S. cerevisiae*-Genom zu überprüfen, wurden Southern-Hybridisierungen durchgeführt. Entsprechende DNA-Fragmente wurden mit Hilfe einer markierten DNA-Sonde identifiziert. In dieser Arbeit wurde das "DIG-System" der Firma ROCHE verwendet. Für die Amplifikation Digoxigenin-markierter DNA-Sonden mittels PCR wurde der "PCR DIG Labeling Mix" (ROCHE) nach Anleitung des Herstellers verwendet, Art und Dauer des Temperaturprofils richteten sich nach den eingesetzten Primern und der DNA-Matrize. Für die Southern-Hybridisierung wurden 20 µl chromosomale DNA aus einer "Smash'n'Grab"-Präparation mit geeigneten Restriktionsenzymen über Nacht verdaut und in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Das Gel wurde dann zweimal je 15 min in 0,25 M HCl gewaschen, kurz mit dH₂O gespült und in 0,5 M NaOH/1 M NaCl (pH 14) für 30 min geschwenkt. Es folgte die Neutralisierung für zweimal 30 min in 1 M NH₄Ac/0,02 M NaOH (pH 7). Die DNA wurde dann durch einen Kapillarblot auf eine positiv geladene Nylonmembran (ROCHE) transferiert und anschließend durch UV-Bestrahlung bei $\lambda = 254$ nm mit 120.000 µJ/cm² in einem „Stratalinker 1800“ kovalent an die Membran gebunden. Dann wurde die Membran für 30 min bis 2 h mit 35 ml Southern-Hybridisierungspuffer (0,5 M Na-Phosphatpuffer, 7 % SDS, pH 7,0) bei 65 °C inkubiert. Die Hybridisierung mit einer frisch denaturierten, Digoxigenin-markierten DNA-Sonde, die in 25 ml Southern-Hybridisierungspuffer gelöst war, erfolgte über Nacht bei 65 °C. Danach wurde die Membran zweimal für 20 min mit Southern-Waschpuffer (0,1 M Na-Phosphatpuffer, 1 % (w/v) SDS, pH 7) bei 65 °C gewaschen.

Es folgte ein 5-minütiger Waschschriff mit 30 ml DIG-Waschpuffer (0,3 % (v/v) Tween-20 in DIG1 (0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH 7,5)) bei RT und die Inkubation mit 40 ml DIG2 (10 ml 10× Blockierungslösung in DIG1) für 30 Min. Anschließend wurde die Membran zusammen mit einem Anti-Digoxigenin-Antikörper, der mit Alkalischer Phosphatase gekoppelt ist („Anti-DIG-AP“, ROCHE), für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Membran zweimal für 15 min mit 30 ml mit DIG-Waschpuffer gewaschen und 5 min lang mit 1× "CDP-Star Assay Buffer" (10 mM Tris, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, pH 9,5) äquibriert. Zum Start der ECL-Reaktion wurde die Membran für 5 min mit 20 ml CDP-Star-Lösung behandelt (25 µl CDP-Star (NEB) in 20 ml 1× Assay Buffer), anschließend in Plastikfolie eingeschweißt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte mit dem "ChemoCam Imager HR16-3200". Die Expositionsdauer richtete sich nach der Signalstärke und betrug 5-30 Min.

5.5.2 Sequenzierung von DNA

DNA-Sequenzierungen wurden von SEQLAB durchgeführt. Hierfür wurden 600-700 µg DNA mit je 20 nmol Primer und 10 mM Tris pH 8,5 in einem Gesamtvolumen von 7 µl gemischt.

5.6 Analyse von RNA

5.6.1 Isolierung von RNA aus *S. cerevisiae*

Für die Isolierung von RNA aus *S. cerevisiae* wurde das RNA-Extraktionskit "RNeasy" (QIAGEN) verwendet. Aus 10-ml-Übernacktkulturen wurden je 30 ml frisches SC-His-Leu-Medium auf eine OD_{600nm} = 0,25 angeimpft und bis zu einer OD_{600nm} = 1 wachsen gelassen. Die Zellen wurden für 3 min bei 2.000 rpm pelletiert und das Pellet wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach Herstellerangaben wurde dann das Protokoll 1c für einen mechanischen Aufbruch der Hefezellen mit Hilfe von Glasperlen (Ø 0,25-0,50 mm) angewandt. Menge und Reinheit der isolierten Gesamt-RNA wurden mit einem "Agilent 2100 Bioanalyzer" analysiert.

5.6.2 Quantitative Realtime-PCR mit "iQ™ SYBR® Green Supermix" (BIO-RAD)

8 µg Gesamt-RNA wurden unter Verwendung des "GeneChip® 3'-Amplification One Cycle cDNA Synthesis Kit" (AFFYMETRIX) in cDNA umgeschrieben. Je 1 µl einer 1:10-Verdünnung der erhaltenen cDNA wurde für einen PCR-Ansatz verwendet. Die cDNA jeweils eines *S. cerevisiae*-Stammes wurde für PCRs mit genspezifischen Primern und mit *CDC28*-spezifischen Primern als Referenz durchgeführt. Ein Reaktionsansatz (25 µl Endvolumen) enthielt außerdem 12.5 µl 2× "iQ™ SYBR® Green Supermix", je 1 µl Primer (Endkonzentration 0,4 µM), 0.5 µl FITC (Endkonzentration 0,02 µM) und 9 µl H₂O. Jeweils ein Ansatz pro Primerpaar wurde für die Erstellung einer Schmelzkurve ohne Matrizen-cDNA hergestellt. Die quantitativen Realtime-PCRs wurden in Duplikaten in "iQ 96-Well PCR-Plates" (BIO-RAD) in einem "MyiQ Single Color Realtime PCR Detection System"-Cycler (BIO-RAD) durchgeführt. Das PCR-Temperaturprofil war wie folgt: 3 min 95 °C, 45×[15 s 95 °C, 30 s 60 °C, 30 s 72 °C]. Der "Threshold"-Zyklus wurde automatisch für jedes Duplikat-Paar bestimmt. Die Genexpression wurde mit der Microsoft Excel-basierten Software "Gene Expression Analysis" (BIO-RAD) quantifiziert.

5.6.3 RNA-Microarray-Analyse nach dem "GeneChip® Expression Analysis Technical Manual" (AFFYMETRIX)

250 ng Gesamt-RNA wurden mit Hilfe des "GeneChip® 3'IVT Labeling Kit" (AFFYMETRIX) in cDNA umgeschrieben und mit Biotin markiert. Die Markierungsreaktion wurde für 16 Stunden bei 40° C durchgeführt. Die resultierende cRNA wurde mit dem "Agilent 2100 Bioanalyzer" auf Reinheit und mögliche Degradierung überprüft, nach Herstellerangaben fragmentiert und erneut analysiert. Die Hybridisierung mit dem Microarray "GeneChip® Yeast Genome 2.0" (AFFYMETRIX) wurde unter Verwendung des "GeneChip® Hybridisation, Wash & Stain Kit" (AFFYMETRIX) durchgeführt. Je 80 µl Hybridisierungscocktail wurden für 16 Stunden bei 45° C mit einem Microarray-Chip in einem Affymetrix-Hybridisierungsofen hybridisiert. Das Waschen und Färben der Arrays erfolgte in einer "Fluidics Station 450". Die Signale wurden mit einem "GeneChip® Scanner 3000", ausgestattet mit der Software "GeneChip® Command Console", detektiert. "Nonscaled probe cell intensity" (.CEL)-Dateien wurden generiert und mit Hilfe der Software in normalisierte .CHP-Files umgewandelt. Die

normalisierten Expressionsdaten wurden in Microsoft Excel eingespeist und um Referenzgene bereinigt, die nicht aus *S. cerevisiae* stammen. Der Abgleich der auf den Arrays enthaltenen Gene mit den *S. cerevisiae*-Gen-Identifikationsnummern erfolgte mit der Datei "Yeast_Annotation_Sc" (AFFYMETRIX). Die Durchschnittswerte von zwei Duplikaten wurden berechnet, und daraus hervorgehend die x-fachen Änderungen der Genexpression ("fold changes") der Mutantenstämme im Vergleich zum Kontrollstam. Zur Vereinfachung der Datenanalyse wurde basierend auf der Excel-Datei mit den Daten aller Gene und Stämme eine "File Maker Pro 8.5"-Datei erstellt. Es wurden solche Gene als differentiell exprimiert im Vergleich zum Kontrollstamm eingeordnet, bei denen die Differenz des Expressionssignals zu dem der Kontrolle mindestens 15 betrug und deren Expression mindestens 1,48-fach in Relation zur Kontrolle verändert war. Die Daten sind in der ArrayExpress-Datenbank (www.ebi.ac.uk) unter der Zugangsnummer E-MEXP-3619 einsehbar.

5.7 Analyse von Proteinen

5.7.1 Herstellung von Proteinextrakten aus *S. cerevisiae*: „Alkalische Lyse“ (nach Yaffe & Schatz, 1984)

1-5 OD_{600nm} Zellen aus einer Hefekultur wurden 1 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert und entweder bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff eingefroren, oder sofort mit dH₂O auf 1 ml aufgefüllt. Die Proben wurden mit je 150 µl Lyselösung (1,85 M NaOH, 7,5 % (v/v) β-Mercaptoethanol) versetzt und für 10 min unter mehrmaligem Vortexen auf Eis inkubiert. Es folgten die Zugabe von 150 µl 50 % (w/v) Trichloressigsäure, die erneute Inkubation auf Eis für 10 min und Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm und 4 °C. Das Pellet wurde in 100 µl Harnstoffpuffer (8 M Harnstoff, 5 % (w/v) SDS, 200 mM NaHPO₄ pH 6,8, 0,1 mM EDTA, 0,03 % (w/v) Bromphenolblau, 15 mg/ml DTT) aufgenommen, bei Farbumschlag des Puffers nach gelb wurden gegebenenfalls 2 µl 2 M Tris-Base zugegeben. Die Proben wurden dann für 10-20 min bei 37 °C geschüttelt. Vor dem Auftragen auf das SDS-Gel erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm für 5 min.

5.7.2 Co-Affinitätsreinigung von GST-markierten Proteinen und assoziierten Proteinen (nach Roberts *et al.*, 1997)

Mit 10-ml-Vorkulturen in SC-Medium mit 2 % Glucose von *S. cerevisiae*-Stämmen, die Plasmide mit *GALI(P)*-getriebenen *GST-MSA*-Genen trugen, wurden 100-ml-Hauptkulturen auf eine $OD_{600nm} = 0,3$ angeimpft und bis zu einer $OD_{600nm} = 0,8$ inkubiert. Dann wurden die Zellen für 3 min bei 2.000 rpm pelletiert und in 80 ml SC-Medium mit 2 % Galaktose für 5 Stunden wachsen gelassen. Die Ernte von 60-80 OD_{600nm} Zellen erfolgte bei 2.000 rpm für 3 min, danach wurden die Zellen zweimal mit 1-3 ml Puffer B (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris pH 7,5) gewaschen. Die Zellpellets wurden in flüssigen Stickstoff eingefroren. Für den Zellaufbruch wurden je 300 µl Puffer B + 0,08 % Triton X-100 + 12 µl "Complete"-Protease-Inhibitor-Cocktail (ROCHE) (1 Tablette in 2 ml dH₂O) und 250 µl Glasperlen (Ø 0,25-0,50 mm) zugegeben und für 5 min bei 4 °C auf dem Multivortex geschüttelt. Weitere 300 µl Puffer B + 0,08 % Triton X-100 + 12 µl "Complete" wurden zugegeben und die Proben wurden für weitere 2 min geschüttelt. Die Sedimentation von Zelltrümmern erfolgte für 15 min bei 13.000 rpm und 4 °C. 600 µl des Extrakts wurden mit 600 µl Puffer B + 0,08 % Triton X-100 + 10 % (v/v) Glycerin versetzt und mit je 120 µl 50 % (v/v) "Glutathion Agarose 4B" (MACHEREY-NAGEL GMBH & CO. KG, Düren, D) in Puffer B für 3 Stunden bei 4 °C rotierend inkubiert. Danach wurde die Agarose dreimal mit je 750 µl Puffer B + 0,08 % Triton X-100 gewaschen (Zentrifugation 1 min 2.000 rpm), in 60 µl Harnstoff-Puffer + 0,5 µl 1 M DTT für 8 min bei 60 °C erhitzt und 1 min bei 2.000 rpm abzentrifugiert. 50 µl des Überstands wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 60 °C erhitzt. Vor dem Auftragen auf ein SDS-Gel erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm für 5 min.

5.7.3 Co-Immunopräzipitation von Protein-A-markierten Proteinen und assoziierten Proteinen

Mit entsprechenden Hefestämmen wurden aus 10-ml-Übernachtskulturen 100-ml-Hauptkulturen in SC-Medium mit 2 % Glucose auf eine $OD_{600nm} = 0,25$ angeimpft und bis zu einer $OD_{600nm} = 1$ inkubiert. 60-80 OD_{600nm} Zellen wurden für 3 min bei 2.000 rpm geerntet und zweimal mit IP-Puffer (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris pH 7,5) gewaschen und in flüssigen Stickstoff eingefroren. Für den Zellaufbruch wurde je 1 ml

IP-Puffer + 0,05 % Tween-20 + 1 µg/ml Pepstatin + 20 µl "Complete"-Protease-Inhibitor-Cocktail (ROCHE) (1 Tablette in 2 ml dH₂O) und 250 µl Glasperlen (Ø 0,25-0,50 mm) zugegeben und für 5 min bei 4 °C auf dem Multivortex geschüttelt. Dann wurden weitere 400 µl IP-Puffer + 0,05 % Tween-20 + 1 µg/ml Pepstatin + 8 µl "Complete" zugegeben und die Proben wurden für 3 min auf dem Multivortex geschüttelt. Nach 15 min Zentrifugieren bei 13.000 rpm wurde 1,1 ml des Überstands mit 110 µl nach Herstellerangaben äquilibrierter 50%iger IgG-Sepharose (GE HEALTHCARE) für 3,5 Stunden bei 4 °C rotierend inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose dreimal mit 750 µl IP-Puffer + 0,05 % Tween-20 gewaschen (Zentrifugation 1 min 2.000 rpm) und in 60 µl Harnstoff-Puffer für 8 min bei 60 °C erhitzt und 1 min bei 2.000 rpm abzentrifugiert. 50 µl des Überstands wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 0,5 µl 1 M DTT versetzt und für 5 min bei 60 °C erhitzt. Vor dem Auftragen auf ein SDS-Gel erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm für 5 min.

5.7.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (nach Laemmli, 1970)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteingemischen erfolgte in diskontinuierlichen Polyacrylamid-Vertikalgelen (Tab. 4.6). Die Elektrophorese der Proben mit 1×Elektrophorese-Puffer (25 mM Tris-Base, 0,25 M Glycin, 0,1 % (w/v) SDS) erfolgte zunächst bei 80 V, bis die Proben vollständig in das Sammelgel eingelaufen waren, und dann bei 200 V für etwa 45 min.

5.7.5 Immunochemische Detektion von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen: „Western Blot“ (nach Towbin *et al.*, 1979)

Der Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulosemembranen (SCHLEICHER & SCHUELL, Dassel, D) wurde durch Elektroblothing über Nacht bei 35 V oder für eine Stunde bei 100 V und 4 °C in einer "Mini-PROTEAN® 3"-Kammer (BIO-RAD) in 1×Transfer-Puffer (25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 0,002 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Methanol) durchgeführt. Zur Überprüfung des Proteintransfers wurde die Membran für 1-2 min in Ponceau-S-Lösung (0,2 % (w/v) Ponceau-S, 3 % (w/v) Trichloressigsäure) gefärbt. Zum Entfärben wurde die Membran dreimal für je 5 min in 1×TBS (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,5) mit

3-5 % (w/v) Milchpulver gewaschen. Um unspezifische Bindungen von Antikörpern an die Membran zu verhindern, wurde die Membran für 30-60 min in TBS/Milchpulver leicht schüttelnd inkubiert. Anschließend erfolgte die Bindung des Primärantikörpers (Tab. 4.5) in 10 ml TBS/Milchpulver für 1-3 Stunden über bei 4 °C über Nacht. Ungebundene Antikörper wurden durch einen 10-minütigen Waschschrift mit TBS/Milchpulver und zweimaliges, ebenso langes Waschen in TBS entfernt. Danach erfolgte eine 1-3-stündige Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper. Nach Waschen (wie vorhergehend) erfolgte die Detektion der Proteine auf der Membran nach der ECL-Methode (Tesfaigzi *et al.*, 1994). Hierfür wurden eine Luminol-Lösung (2,5 mM Luminol, 400 µM Paracuomarat, 100 mM Tris pH 8,5) und eine Wasserstoffperoxid-Lösung (5,4 mM H₂O₂, 100 mM Tris pH 8,5) frisch angesetzt, vereinigt, zur Membran gegeben und mit dieser für 1-2 min leicht schüttelnd inkubiert. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte mit dem "ChemoCam Imager". Die Expositionsdauer richtete sich nach der Signalstärke und lag zwischen 5 Sek und 30 min. Die Quantifizierung der Immunoblot-Signale wurde mit der Software "LabImage 1D" (KAPELAN BIO-IMAGING, Leipzig, D).

5.7.6 Photometrischer β -Galaktosidasetest (nach Rose & Botstein, 1983)

S. cerevisiae-Kulturen, die chromosomal integrierte *lacZ*-Reportergene trugen, wurden über Nacht bei 30 °C in 5 ml SC-Medium mit Glucose angezogen. 10-ml-Hauptkulturen wurden auf eine OD_{600nm} = 0,3 angeimpft und bis zu einer OD_{600nm} = 1 bei 30 °C inkubiert. Dann wurde die Zellsuspension bei 3000 rpm für 5 min abzentrifugiert. Das Sediment wurde mit 3 ml Aufbruchpuffer (100 mM Tris pH 8, 20 % Glycerin (v/v)) gewaschen, in 200 µl Aufbruchpuffer mit 1 mM DTT resuspendiert und bei -20 °C eingefroren. Für den β -Galaktosidasetest wurden die Zellen mit ungefähr 200 µl Glasperlen (\varnothing 0,25-0,50 mm) durch 5-minütiges Schütteln bei 4°C auf einem Multivortex aufgebrochen. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugieren mit für 15 min bei 13.000 rpm und 4°C entfernt. Je 100 µl Überstand wurden in eine 96-Well-Mikrotiterplatte (GREINER BIO-ONE, Frickenhausen, D) überführt. Je 10 µl der Proteinextrakte wurden dann in Duplikaten in neue "Wells" übertragen mit 200 µl Z-Puffer (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 0,25 % (v/v) β -Mercaptoethanol) versetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 27 µl o-NPG (4 mg/ml in Z-Puffer) gestartet. Die Reaktionsansätze wurden anschließend solange bei

Interessanterweise gibt es bei *FLO11-CFP* deutliche Schwankungen der Signalintensität 30 °C inkubiert, bis eine Gelbfärbung zu erkennen war. Die Zugabe von 67 µl 1 M Na₂CO₃-Lösung stoppte die Reaktion. Die Reaktionszeit wurde notiert und die optische Dichte der Proben bei einer Wellenlänge von 415 nm gemessen. Parallel hierzu wurde die Proteinkonzentration der Extrakte nach (Bradford, 1976) ermittelt. Die spezifische Aktivität des Proteinextraktes wurde mit der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Spezifische Aktivität} = \frac{OD_{415nm} \times 0,304}{0,0045 \times \text{Proteinkonz. (mg/ml)} \times \text{Extraktvol. (ml)} \times \text{Zeit (min)}}$$

Dabei entspricht die OD_{415nm} der gemessenen Extinktion des Reaktionsproduktes o-Nitrophenol. Der Faktor 0,304 entspricht dem Reaktionsvolumen und der Faktor 0,0045 repräsentiert den Extinktionskoeffizienten von 1 nM/ml o-Nitrophenol-Lösung. Die spezifische Aktivität wird in [nM/Min/mg Protein] angegeben.

1.1.1 Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford, 1976)

Der Proteingehalt der Zellextrakte mit BSA als Proteinstandard bestimmt. Hierfür wurde eine Eichreihe mit BSA-Konzentrationen von 0-2 g/ml hergestellt. 10 µl des Proteinextraktes und der Eichreihe wurden mit je 300 µl einer 1:5-Verdünnung von Bradford-Reagenz "Roti-Quant®" (CARL ROTH) mit dH₂O vermischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei λ = 595 nm gemessen.

1.2 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) (nach Aparicio et al. 2005)

1.2.1 Herstellung von mit Formaldehyd kreuzvernetzten Chromatinextrakten aus *S. cerevisiae*

15-ml-Vorkulturen von Hefestämmen, die endogen Myc-markierte Proteine herstellen wurden in SC-Medium ohne Histidin und Leucin über Nacht bei 30 °C wachsen gelassen. Mit diesen wurden 150-ml-Hauptkulturen in 500ml-Schikanekolben auf eine OD₆₀₀ = 0,25 im gleichen Medium angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ = 1 inkubiert. Für die Kreuzvernetzungsreaktion wurden 4,2 ml 37%-iges Formaldehyd unter leichtem

leicht schüttelnd unter dem Abzug für 30 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 22,5 ml 2,5 M Glycin (Endkonzentration 320 mM) wurde nach einer etwa 10-minütigen Inkubation die Kreuzvernetzungsreaktion beendet. Die Zellernte (3×50 ml) erfolgte durch Zentrifugation für 5 min bei 2.500×g und 4° C. Die Zellen wurden 2× mit 25 ml eiskaltem 1×TBS gewaschen, mit je 1 ml TBS in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt, erneut abzentrifugiert und die Zellpellets wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Zu je einem Zellpellet aus 50 ml Kultur wurden 250 µl Glasperlen (Ø 0,25-0,50 mm) sowie und 300 µl FA-Lysepuffer (50 mM HEPES pH 7,5 mit KOH eingestellt, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % TX-100, 0,1 % Natrium-Desoxycholat (SIGMA), 0,1 % SDS) + 2 mM PMSF + Complete (1 Tablette auf 50 ml FA-Lysepuffer) zugegeben. Die Proben wurden auf dem Multivortexer bei 4 °C 4× für je 8 min geschüttelt, mit jeweils Inkubation auf Eis für 2 Min, um ein Überhitzen des Ansatzes und eine so induzierte Reversion der Kreuzvernetzung zu vermeiden. Der Zellaufbruch wurde mikroskopisch überprüft.

Um das Zell-Lysat von den Glasperlen zu trennen, wurde mit einer heißen Injektionsnadel „G24“ je ein Loch in Boden und Deckel der Reaktionsgefäße gestochen und mit Hilfe eines Adapterstücks aus dem oberen Ende einer 5ml-Spritze in 15 ml-Reaktionsgefäße eingesetzt und für 1 min bei 1.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Eluat wurde zur Sedimentation des Chromatins in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und für 15 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde mit 1 ml eiskaltem FA-Puffer + 2 mM PMSF + Complete überschichtet.

Für die Fragmentierung der DNA mittels Ultraschall wurden die Proben in einem gekühlten Metallblock fixiert und mit einer großen Spitze des "Sonopuls"-Ultraschallgeräts bei 30 % Leistung 4×30 s behandelt. Nach jedem Zyklus wurden die Proben für 1,5 min auf Eis gekühlt. Es sollten Fragmente mit einer durchschnittlichen Länge von 500 bp entstehen. Um unlösliche Komplexe und Zelltrümmer zu sedimentieren, wurden die Proben für 30 min bei 13000 rpm und 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 15ml-Gefäß überführt, mit eiskaltem FA-Lysepuffer auf ein Gesamtvolumen von 3 ml aufgefüllt und in 1 ml-Aliquots aufgeteilt, die in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden. Zur Überprüfung der Fragmentgröße wurden vorher 100 µl des Chromatinextrakts entnommen, 100 µl ChIP-Elutionspuffer (50 mM Tris pH

7,5, 10 mM EDTA, 1 % SDS) zugegeben, bei 65°C über Nacht inkubiert und verfahren wie unter Abschnitt 5.8.3 (Reinigung immunopräzipitierter DNA-Fragmente).

5.8.2 Immunopräzipitation

Je 1 ml Chromatinextrakt wurden aufgetaut, in 1,5ml-Reaktionsgefäße überführt und zusammen mit Primärantikörper (3 µl Mouse anti-Myc) für 90 min bei 4 °C bei 8 rpm rotierend inkubiert. Dann wurden zu jedem Ansatz 50 µl einer 50%-igen "rProteinA Sepharose Fast Flow" (GE HEALTHCARE) zugegeben und die Ansätze wurden für 3,5 Stunden weiter inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose durch 1-minütiges Zentrifugieren bei 2.000 rpm und 4 °C sedimentiert. 20 µl des Überstands wurden als "Input"-Probe mit 100 µl TE und 80 µl ChIP-Elutionspuffer versetzt.

Die Sepharose wurde 2× mit je 700 µl FA-Lysepuffer bei RT gewaschen. Hierfür wurden die Proben jeweils für 3 min auf dem Rollinkubator inkubiert und danach 1 min bei 2.000 rpm abzentrifugiert. Es folgen jeweils zwei Waschschrte mit 700 µl ChIP-Waschpuffer (10 mM Tris pH 8, 0,25 M LiCl, 1 mM EDTA, 0,5 % Nonidet-P40, 0,5 % Natrium-Desoxycholat) und mit TE. Danach wurde die Sepharose in 100 µl ChIP-Elutionspuffer vorsichtig resuspendiert und für 8 min bei 60 °C erhitzt, um die Protein-DNA-Komplexe wieder vom Sepharose-Antikörperkomplex zu lösen. Schließlich wurden nach der letzten Zentrifugation (1 min 2.000 rpm, RT) 100 µl des Überstands als "IP"-Probe in ein PCR-Gefäß überführt und 100 µl TE zugegeben. Die IP-Proben und die Input-Proben wurden zur Reversion der Kreuzvernetzung in einem Thermocycler bei 65 °C über Nacht (15-16 Stunden) inkubiert.

5.8.3 Reinigung immunopräzipitierter DNA-Fragmente

Um die abgelösten Proteine zu degradieren, wurden zu den Input-Proben und bei Überprüfung der Fragmentgrößen je 10 µl Proteinase K (ROCHE) zugegeben. Zu den IP-Proben wurden 2,5 µl Proteinase zugegeben. Die Ansätze wurden für eine Stunde bei 50° C inkubiert. Zur Reinigung der Ansätze von Proteinresten wurde eine Phenolextraktion mit je 1 Vol einer Roti®-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (CARL ROTH) durchgeführt. Es folgte die Zentrifugation für 2 min bei 13.000 rpm und 4 °C. Die obere, wässrige Phase (etwa 180 µl) wurde abgenommen, 1 Vol eiskaltes EtOH zugegeben und für 20 min bei -20 °C inkubiert. Nach 10-minütiger

Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C wurde das entstandene DNA-Pellet für 15 min bei 37 °C getrocknet. Zur Input-Probe wurden 50 µl TE + 1 µl RNase A (10 mg/ml) zugegeben, zur IP-Probe wurden 30 µl TE + 0,5 µl RNase A zugegeben. Die Proben wurden für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die DNA-Lösungen in einer PCR verwendet oder bei –20 °C gelagert.

Bei Bestimmung der Fragmentgröße wurde das DNA-Pellet in 30 µl TE + 2 µl RNase A resuspendiert, 15 min bei 37°C inkubiert und der komplette Ansatz wurde in einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt.

5.8.4 PCR

Zur Überprüfung der mittels ChIP angereicherten DNA-Fragmente wurde eine PCR durchgeführt. Ein Ansatz bestand aus jeweils 2 µl DNA-Matrize, 2 µl Vorwärts-Primer [10 pmol], 2 µl Rückwärts-Primer [10 pmol], 1 µl dNTPs [je 10 mM], 5 µl 10x Reaktionspuffer, 0,25 µl Taq-DNA-Polymerase [5 U/µl] (NEB), 1 µl MgCl₂ [25 mM] und 37,5 µl H₂O. Das Temperaturprofil war wie folgt: 2 min 95 °C, 29×[30 s 95 °C, 30 s 55 °C, 25 s 68 °C]. Die Analyse der Produkte erfolgte durch Auftrennung in einem 2%-igen Agarosegel. Hierfür wurden je 10 µl der Input-PCR-Ansätze und 25 µl der IP-Ansätze aufgetragen.

5.9 Quantitative Fluoreszenzmikroskopie

5.9.1 Fluoreszenzmikroskopie

Übernachtskulturen von Hefestämmen, die fluoreszierende Proteine herstellen, wurden am folgenden Tag in 2-5 ml LFM-Medium mit Glucose und den entsprechenden Aminosäuren 1:5 - 1:20 verdünnt und für 3-5 Stunden bei 30 °C inkubiert. Dann wurden 150-200 µl der Kulturen in Glasboden-Mikroskopieschälchen (MATTEK CORP., Ashland, MA, USA) gegeben, die vorher mit 0,1 % Concanavalin A (SIGMA) beschichtet wurden. Nach 5-10minütiger Inkubation wurden nicht haftende *S. cerevisiae*-Zellen durch Waschen mit LFM entfernt. Schließlich wurden 2 ml frisches LFM in die Schälchen gegeben und die Zellen wurden für 2 Stunden bei RT inkubiert. Die Zellen wurden dann im Durchlicht und im CFP-, YFP- und/oder RFP-Kanal fotografiert, unter Verwendung des "63× Plan Apochromat" Öl-Objektivs (ZEISS). Bei Hefestämmen, die fluoreszenzmarkierte Transkriptionsfaktoren trugen, wurden Z-

Bildstapel aufgenommen, bei denen jeweils von der Fokusebene ausgehend Bilder in 0,5 μm -Schritten gemacht wurden. Meist wurden 6-8 Bilder mit je 20-50 Zellen aufgenommen. Die Belichtungszeiten richteten sich nach der Fluoreszenzintensität und betrugen 100-500 ms. Dann wurden entweder 1 μM α -Faktor (VWR) oder 2 μl Methanol zu den Zellen zugegeben und die Zellen wurden für 2 Stunden bei RT inkubiert, bis weitere Bilder aufgenommen wurden.

Alternativ wurde je 1 ml aus den Hauptkulturen entnommen und bei 2.500 rpm für 2 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgeschüttet und die Zellen wurden im verbleibenden LFM (etwa 100 μl) resuspendiert. 5 μl dieser Zellsuspension wurden auf Objektträger aufgetropft, die zuvor mit 1%iger Agarose beschichtet wurden. Dann erfolgte die Fluoreszenzmikroskopie wie oben beschrieben.

5.9.2 Quantifizierung der Mikroskopie-Bilder mit "ImageJ" (nach Jungbluth *et al.*, 2010)

Die Bearbeitung und Signalquantifizierung der Mikroskopiebilder erfolgte mit dem Programm "ImageJ" (Version 1.43u; Collins 2007) wie in Jungbluth *et al.*, 2010. Anhand des Durchlichtbildes wurde zunächst eine Suchmaske für die Zellen erstellt. Hierfür wurden die Zellumrisse mit den Befehlen "find edges", "enhance contrast", "gaussian blur" (Radius = 2) und "make binary" sichtbar gemacht, dann wurde mit den Befehlen "make binary", "fill holes" und "create selection" eine Maske für die vollständige Zellen erstellt. Die Maske wurde auf die Fluoreszenzbilder übertragen. Mit der Funktion "measure" wurden die durchschnittlichen Signalintensitäten der Bilder ermittelt. Von den Z-Stapeln wurden Maximumprojektionen erstellt und in diesen die Signalintensitäten gemessen. Die weitere Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel. Zunächst wurde der Durchschnitt aus allen Bildern einer Messung bestimmt. Von den erhaltenen Werten in "arbitrary units" wurden die Werte eines Kontrollstammes, der keine fluoreszenzmarkierten Proteine besitzt, abgezogen. Aus diesen Werten wurden Durchschnittswerte aller relevanter Messungen mit einem fluoreszierenden Protein gebildet. Optional erfolgte die Berechnung der relativen Signalintensitäten (in Prozent) im Vergleich zu einem Kontrollstamm.

5.10 Analyse von *S. cerevisiae*

5.10.1 Waschtest zur Bestimmung des adhäsiven Wachstums auf Agar (Roberts & Fink, 1994)

Die *S. cerevisiae*-Stämme wurden mit sterilen Impfösen großflächig auf Agarplatten ausgestrichen und für 4-5 Tage bei 30 °C inkubiert. Das Wachstum der Hefestämme wurde fotografisch festgehalten. Anschließend wurden die Platten vorsichtig unter einem Strahl dH₂O Wassers geschwenkt, wobei nicht adhäsiv wachsende Hefestämme gewaschen wurden. Optional wurden weitere, stärker werdende Waschschrte durchgeführt. Nach jedem Waschschrte wurde das Ergebnis fotografisch dokumentiert.

5.10.2 Adhäsionstest an Polystyrol (nach Reynolds & Fink, 2001)

Die Hefestämme wurden über Nacht bei 30 °C in 5-ml-Vorkulturen in SC-Medium + 2 % Glucose angezogen. Am nächsten Tag wurden 10-ml-Hauptkulturen mit dem gleichen Medium auf eine OD_{600nm} = 0,3 angeimpft und bis zu einer OD_{600nm} = 0,7 bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden für 3 min bei 2.000 rpm sedimentiert und 2× in SC-Medium ohne C-Quelle gewaschen. Dann wurde die Zelldichte der Kulturen mit SC-Medium + 0,2 % Glucose auf eine OD_{600nm} = 0,7 eingestellt. Der niedrige Glucosegehalt dient zur Induktion der biofilmspezifischen Transkription. Jeweils 600 µl der Zellsuspensionen wurden in 48-Well-Polystyrol-Platten (GREINER BIO-ONE, Bestellnummer 677102) überführt und für 3,5 Stunden bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden je 30 µl einer 1%igen (w/v) Kristallviolett-Lösung zugegeben, um die *S. cerevisiae*-Zellen zu färben. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei RT. Die Platten wurden dann vorsichtig in einem Bad mit eiskaltem dH₂O geschwenkt, um überschüssigen Farbstoff und nichtadhäsive Hefezellen zu entfernen. Nach dem Abtropfen über Nacht wurde der in adhäsiven Zellen verbliebene Farbstoff in 600 µl 1%-iger SDS-Lösung resuspendiert und für 30 min inkubiert. Um die Hefezellen zu sedimentieren, wurden die Platten für 2 min bei 3.000 rpm zentrifugiert. Zur Quantifizierung der Adhäsion wurden 100 µl der Kristallviolettlösungen in 96-Well-Mikrotiterplatten überführt und die OD_{595nm} der Proben wurde gemessen.

5.10.3 Qualitativer Paarungstest

Die zu überprüfenden *MATa*-Hefestämme wurden großflächig auf Agarplatten mit entsprechendem Selektivmedium ausgestrichen und für 1-2 Tage bei 30 °C inkubiert. Mit den *MATa*- und *MATα*-Testerstämmen wurde genauso verfahren, allerdings wurden sie auf der kompletten Agarplatte ausgestrichen. Für den Paarungstest wurden die zu überprüfenden Hefestämme und zusammen mit jeweils einem Testerstamm auf einem Samtstempel übertragen. Mit den Zellmischungen auf dem Samtstempel wurde eine YPD-Agarplatte beimpft, auf der die Zellen für 6 Stunden bei 30 °C zur Paarung inkubiert wurden. Danach wurden die Zellen mit Hilfe des Samtstempels auf eine YNB-Agarplatte mit Selektionsmedium übertragen, auf der nur diploide Zellen wachsen können. Nach 2 Tagen wurde das Ergebnis fotografisch festgehalten.

5.10.4 Bestimmung der Zellgröße durch Impedanzmessung mit dem "Multisizer™ 3" Partikelanalysegerät

Mit 3-ml-Übernachtkulturen in SC-Medium wurden 10-15-ml-Hauptkulturen auf eine $OD_{600nm} = 0,3$ angeimpft und bis zu einer $OD_{600nm} = 0,7-0,8$ inkubiert. 50-150 µl der Hefekulturen wurden in 10 ml "Isoton® II Diluent" (BECKMAN COULTER) (0,9 % (w/v) NaCl) verdünnt. Das Volumen von jeweils $30-50 \times 10^3$ Zellen eines Stammes wurde mit dem "Multisizer™ 3" Partikelanalysegerät (BECKMAN COULTER) und einer 100-µm-Kapillare bestimmt. Dies funktioniert nach dem Impedanzmessverfahren, bei dem Widerstandsänderungen beim Durchgang von Partikeln durch eine Kapillare gemessen werden. Die Widerstandsänderungen korrelieren mit der Größe von Partikeln. Das Gerät errechnet anhand der Größenordnung der Widerstandsänderung das Kugelvolumen eines Partikels. Die in dieser Arbeit bestimmten Zellgrößen sind durchschnittliche Medianwerte aus einem Größenbereich von $20-200 \mu m^3$ bzw. Femtolitern (fl).

6 Literatur

- Abascal, F., Carmona-Saez, P., Carazo, J.-M. & Pascual-Montano, A. (2008).** ChIPCodis: mining complex regulatory systems in yeast by concurrent enrichment analysis of chip-on-chip data. *Bioinformatics* **24**, 1208–1209.
- Alberghina, L., Mavelli, G., Drovandi, G., Palumbo, P., Pessina, S., Tripodi, F., Coccetti, P. & Vanoni, M. (2012).** Cell growth and cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*: basic regulatory design and protein-protein interaction network. *Biotechnol Adv* **30**, 52–72.
- Albuquerque, C. P., Smolka, M. B., Payne, S. H., Bafna, V., Eng, J. & Zhou, H. (2008).** A multidimensional chromatography technology for in-depth phosphoproteome analysis. *Mol Cell Proteomics* **7**, 1389–1396.
- Allen, J. B., Zhou, Z., Siede, W., Friedberg, E. C. & Elledge, S. J. (1994).** The SAD1/RAD53 protein kinase controls multiple checkpoints and DNA damage-induced transcription in yeast. *Genes & Dev* **8**, 2401–2415.
- Anbanandam, A., Albarado, D. C., Nguyen, C. T., Halder, G., Gao, X. & Veeraraghavan, S. (2006).** Insights into transcription enhancer factor 1 (TEF-1) activity from the solution structure of the TEA domain. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 17225–17230.
- Andrews, B. & Herskowitz, I. (1989).** The yeast SWI4 protein contains a motif present in developmental regulators and is part of a complex involved in cell-cycle-dependent transcription. *Nature* **342**, 830–833.
- Andrianopoulos, A. & Timberlake, W. E. (1991).** ATTS, a new and conserved DNA binding domain. *Plant Cell* **3**, 747–748.
- Aparicio, O., Geisberg, J. V., Sekinger, E., Yang, A., Moqtaderi, Z. & Struhl, K. (2005).** Chromatin immunoprecipitation for determining the association of proteins with specific genomic sequences in vivo. *Current Protocols in Molecular Biology* **Chapter 21**, Unit 21.3.
- Ashe, M., de Bruin, R. a M., Kalashnikova, T., McDonald, W. H., Yates, J. R. & Wittenberg, C. (2008).** The SBF- and MBF-associated protein Msa1 is required for proper timing of G1-specific transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **283**, 6040–6049.
- Badis, G., Chan, E. T., van Bakel, H., Pena-Castillo, L., Tillo, D., Tsui, K., Carlson, C. D., Gossett, A. J., Hasinoff, M. J. & weitere (2008).** A library of yeast transcription factor motifs reveals a widespread function for Rsc3 in targeting nucleosome exclusion at promoters. *Mol Cell* **32**, 878–887.
- Ballensiefen, W. & Schmitt, H. D. (1997).** Periplasmic Bar1 protease of *Saccharomyces cerevisiae* is active before reaching its extracellular destination. *Eur J Biochem* **247**, 142–147.
- Bandura, J. L. & Edgar, B. A. (2008).** Yorkie and Scalloped: partners in growth activation. *Dev Cell* **14**, 315–316.
- Bao, M. Z., Schwartz, M. A., Cantin, G. T., Yates, J. R. & Madhani, H. D. (2004).** Pheromone-dependent destruction of the Tec1 transcription factor is required for MAP kinase signaling specificity in yeast. *Cell* **119**, 991–1000.

- Bao, M. Z., Shock, T. R. & Madhani, H. D. (2010).** Multisite phosphorylation of the *Saccharomyces cerevisiae* filamentous growth regulator Tec1 is required for its recognition by the E3 ubiquitin ligase adaptor Cdc4 and its subsequent destruction in vivo. *Eukaryot Cell* **9**, 31–36.
- Bardwell, L., Cook, J. G., Zhu-Shimoni, J. X., Voora, D. & Thorner, J. (1998a).** Differential regulation of transcription: repression by unactivated mitogen-activated protein kinase Kss1 requires the Dig1 and Dig2 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 15400–15405.
- Bardwell, L., Cook, J. G., Voora, D., Baggott, D. M., Martinez, A. R. & Thorner, J. (1998b).** Repression of yeast Ste12 transcription factor by direct binding of unphosphorylated Kss1 MAPK and its regulation by the Ste7 MEK. *Genes & Dev* **12**, 2887–2898.
- Bardwell, L. (2005).** A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway. *Peptides* **25**, 339–350.
- Baur, M., Esch, R. K. & Errede, B. (1997).** Cooperative binding interactions required for function of the Ty1 sterile responsive element. *Mol Cell Biol* **17**, 4330–4337.
- Beck, T. & Hall, M. N. (1999).** The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* **402**, 689–692.
- Bender, A. & Sprague, G. F. (1987).** MATa1 protein, a yeast transcription activator, binds synergistically with a second protein to a set of cell-type-specific genes. *Cell* **50**, 681–691.
- Boeckstaens, M., André, B. & Marini, A. M. (2008).** Distinct transport mechanisms in yeast ammonium transport/sensor proteins of the Mep/Amt/Rh family and impact on filamentation. *J Biol Chem* **283**, 21362–21370.
- Borneman, A. R., Leigh-Bell, J. A., Yu, H., Bertone, P., Gerstein, M. & Snyder, M. (2006).** Target hub proteins serve as master regulators of development in yeast. *Genes & Dev* **20**, 435–448.
- Borneman, A. R., Gianoulis, T. A., Zhang, Z. D., Yu, H., Rozowsky, J., Seringhaus, M. R., Wang, L. Y., Gerstein, M. & Snyder, M. (2007).** Divergence of transcription factor binding sites across related yeast species. *Science* **317**, 815–9.
- Botstein, D. & Fink, G. R. (2011).** Yeast: an experimental organism for 21st Century biology. *Genetics* **189**, 695–704.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–54.
- Braus, G. H., Grundmann, O., Brückner, S. & Mösch, H.-U. (2003).** Amino acid starvation and Gcn4p regulate adhesive growth and *FLO11* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **14**, 4272–4284.
- de Bruin, R. A. M., Kalashnikova, T. I. & Wittenberg, C. (2008).** Stb1 collaborates with other regulators to modulate the G1-specific transcriptional circuit. *Mol Cell Biol* **28**, 6919–6928.
- Brückner, S. (2002).** Isolierung neuer Interaktionspartner von Tec1p aus *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit. *Institut für Mikrobiologie, Georg-August-Universität zu Göttingen*.
- Brückner, S. (2007).** Regulation des TEA/ATTS-Transkriptionsfaktors Tec1 durch die Pheromon-induzierte MAPK-Kaskade und den TOR-Signalweg in *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation. *Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg*.

- Brückner, S. & Mösch, H.-U. (2012).** Choosing the right lifestyle: adhesion and development in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **36**, 25–58.
- Brückner, S., Köhler, T., Braus, G. H., Heise, B., Bolte, M. & Mösch, H.-U. (2004).** Differential regulation of Tec1 by Fus3 and Kss1 confers signaling specificity in yeast development. *Curr Genet* **46**, 331–342.
- Brückner, S., Kern, S., Birke, R., Saugar, I., Ulrich, H. D. & Mösch, H.-U. (2011).** The TEA transcription factor Tec1 links TOR and MAPK pathways to coordinate yeast development. *Genetics* **189**, 479–494.
- Bölker, M. (2001).** *Ustilago maydis* - a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology* **147**, 1395–1401.
- Bürglin, T. R. (1991).** The TEA domain: a novel, highly conserved DNA-binding motif. *Cell* **66**, 11–12.
- Cairns, B. R., Lorch, Y., Li, Y., Zhang, M., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Du, J., Laurent, B. & Kornberg, R. D. (1996).** RSC, an essential, abundant chromatin-remodeling complex. *Cell* **87**, 1249–1260.
- Calderone, R. A. & Fonzi, W. A. (2001).** Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **9**, 327–335.
- Cao, X., Pfaff, S. L. & Gage, F. H. (2008).** YAP regulates neural progenitor cell number via the TEA domain transcription factor. *Genes & Dev* **22**, 3320–3334.
- Cappellaro, C., Baldermann, C., Rachel, R. & Tanner, W. (1994).** Mating type-specific cell-cell recognition of *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall attachment and active sites of α - and α -agglutinin. *EMBO J* **13**, 4737–4744.
- Casadaban, M. J. & Cohen, S. N. (1980).** Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **138**, 179–207.
- Causton, H. C., Ren, B., Koh, S. S., Harbison, C. T., Kanin, E., Jennings, E. G., Lee, T. I., True, H. L., Lander, E. S. & weitere (2001).** Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol Biol Cell* **12**, 323–37.
- Chan, R. K. & Otte, C. A. (1982).** Physiological characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants supersensitive to G1 arrest by a factor and α factor pheromones. *Mol Cell Biol* **2**, 21–29.
- Chavel, C. a., Dionne, H. M., Birkaya, B., Joshi, J. & Cullen, P. J. (2010).** Multiple signals converge on a differentiation MAPK pathway. *PLoS Genetics* **6**, e1000883.
- Chen, L., Loh, P. G. & Song, H. (2010).** Structural and functional insights into the TEAD-YAP complex in the Hippo signaling pathway. *Protein Cell* **1**, 1073–1083.
- Chen, R. E. & Thorner, J. (2007).** Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 1311–1340.
- Chou, S., Huang, L. & Liu, H. (2004).** Fus3-regulated Tec1 degradation through SCF^{Cdc4} determines MAPK signaling specificity during mating in yeast. *Cell* **119**, 981–90.
- Chou, S., Lane, S. & Liu, H. (2006).** Regulation of mating and filamentation genes by two distinct Ste12 complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **26**, 4794–805.

- Chou, S., Zhao, S., Song, Y., Liu, H. & Nie, Q. (2008).** Fus3-triggered Tec1 degradation modulates mating transcriptional output during the pheromone response. *Mol Syst Biol* **4**, 212.
- Collins, T. J. (2007).** ImageJ for microscopy. *Biotechniques* **43**, 25–30.
- Colman-Lerner, A., Gordon, A., Serra, E., Chin, T., Resnekov, O., Endy, D., Pesce, C. G. & Brent, R. (2005).** Regulated cell-to-cell variation in a cell-fate decision system. *Nature* **437**, 699–706.
- Cook, J. G., Bardwell, L., Kron, S. J. & Thorner, J. (1996).** Two novel targets of the MAP kinase Kss1 are negative regulators of invasive growth in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Dev* **10**, 2831–2848.
- Cook, J. G., Bardwell, L. & Thorner, J. (1997).** Inhibitory and activating functions for MAPK Kss1 in the *S. cerevisiae* filamentous-growth signalling pathway. *Nature* **390**, 85–88.
- Cook, M. & Tyers, M. (2007).** Size control goes global. *Curr Opin Biotechnol* **18**, 341–350.
- Costanzo, M., Baryshnikova, A., Bellay, J., Kim, Y., Spear, E. D., Sevier, C. S., Ding, H., Koh, J. L. Y., Toufighi, K. & weitere (2010).** The genetic landscape of a cell. *Science* **327**, 425–431.
- Crespo, J. L. & Hall, M. N. (2002).** Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 579–591.
- Cullen, P. J. & Sprague, G. F. (2000).** Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 13619–13624.
- Cullen, P. J. & Sprague, G. F. (2012).** The regulation of filamentous growth in yeast. *Genetics* **190**, 23–49.
- Cullen, P. J., Sabbagh, W., Graham, E., Irick, M. M., van Olden, E. K., Neal, C., Delrow, J., Bardwell, L. & Sprague, G. F. (2004).** A signaling mucin at the head of the Cdc42- and MAPK-dependent filamentous growth pathway in yeast. *Genes & Dev* **18**, 1695–1708.
- Cutler, N. S., Pan, X., Heitman, J. & Cardenas, M. E. (2001).** The TOR signal transduction cascade controls cellular differentiation in response to nutrients. *Mol Biol Cell* **12**, 4103–4113.
- Delanoue, R., Legent, K., Godefroy, N., Flagiello, D., Dutriaux, A., Vaudin, P., Becker, J. L. & Silber, J. (2004).** The *Drosophila* wing differentiation factor vestigial-scalloped is required for cell proliferation and cell survival at the dorso-ventral boundary of the wing imaginal disc. *Cell Death Diff* **11**, 110–122.
- Desany, B. A., Alcasabas, A. A., Bachant, J. B. & Elledge, S. J. (1998).** Recovery from DNA replicational stress is the essential function of the S-phase checkpoint pathway. *Genes & Dev* **12**, 2956–2970.
- Dirick, L., Moll, T., Auer, H. & Nasmyth, K. (1992).** A central role for *SWI6* in modulating cell cycle Start-specific transcription in yeast. *Nature* **357**, 508–513.
- Dong, J., Feldmann, G., Huang, J., Wu, S., Zhang, N., Comerford, S. A., Gayyed, M. F., Anders, R. A., Maitra, A. & Pan, D. (2007).** Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals. *Cell* **130**, 1120–1133.
- Douglas, L. M., Li, L., Yang, Y. & Dranginis, A. M. (2007).** Expression and characterization of the flocculin Flo11/Muc1, a *Saccharomyces cerevisiae* mannoprotein with homotypic properties of adhesion. *Eukaryot Cell* **6**, 2214–2221.

- Elia, L. & Marsh, L. (1998).** A role for a protease in morphogenic responses during yeast cell fusion. *J Cell Biol* **142**, 1473–1485.
- Elledge, S. J. & Davis, R. W. (1990).** Two genes differentially regulated in the cell cycle and by DNA-damaging agents encode alternative regulatory subunits of ribonucleotide reductase. *Genes & Dev* **4**, 740–751.
- Enserink, J. M. & Kolodner, R. D. (2010).** An overview of Cdk1-controlled targets and processes. *Cell Div* **5**, 11.
- Erdman, S. (1998).** Pheromone-regulated genes required for yeast mating differentiation. *J Cell Biol* **140**, 461–483.
- Errede, B. & Ammerer, G. (1989).** STE12, a protein involved in cell-type-specific transcription and signal transduction in yeast, is part of protein-DNA complexes. *Genes & Dev* **3**, 1349–1361.
- Esch, R. K., Wang, Y. & Errede, B. (2006).** Pheromone-induced degradation of Ste12 contributes to signal attenuation and the specificity of developmental fate. *Eukaryot Cell* **5**, 2147–2160.
- Farrance, I. K. G. & Ordahl, C. P. (1996).** The role of transcription enhancer factor-1 (TEF-1) related proteins in the formation of M-CAT binding complexes in muscle and non-muscle tissues. *J Biol Chem* **271**, 8266–8274.
- Farrance, I. K. G., Mar, J. H. & Ordahl, P. (1992).** M-CAT binding factor is related to the SV40 enhancer binding factor, TEF-1. *J Biol Chem* **267**, 17234–17240.
- van der Felden, J. (2008).** Die Rolle der Tec1-Ste12-Heterodimerbildung bei der Transkriptionskontrolle in *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit. *Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg*.
- Foury, F. (1997).** Human genetic diseases: a cross-talk between man and yeast. *Gene* **195**, 1–10.
- Freifelder, D. (1960).** Bud position in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **80**, 576–568.
- Fries, S. J. (2012).** Analyse der Fus3/Kss1-MAPK-Aktivität in der Bäckerhefe in einem *in vivo* System. Bachelorarbeit. *Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg*.
- Gannon, F. & Powell, R. (1991).** Construction of recombinant DNA molecules. In *Essential Molecular Biology: A Practical Approach*, 1st Edn., pp. 143–160. Edited by T. A. Brown. IRL Press, Oxford, U.K.
- Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D. & Brown, P. O. (2000).** Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* **11**, 4241–4257.
- Gavrias, V., Alex, A., Gimeno, C. J. & Timberlake, W. E. (1996).** *Saccharomyces cerevisiae* *TEC1* is required for pseudohyphal growth. *Mol Microbiol* **19**, 1255–1263.
- Ghaemmaghami, S., Huh, W.-K., Bower, K., Howson, R. W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E. K. & Weissman, J. S. (2003).** Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* **425**, 737–741.
- Gietz, R. D. & Sugino, A. (1988).** New yeast - *Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **14**, 527–534.
- Gimeno, C. J., Ljungdahl, P. O., Styles, C. A. & Fink, G. R. (1992).** Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and *RAS*. *Cell* **68**, 1077–1090.

- Giot, L., Bader, J. S., Brouwer, C., Chaudhuri, A., Kuang, B., Li, Y., Hao, Y. L., Ooi, C. E., Godwin, B. & weitere (2003).** A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science* **302**, 1727–1736.
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C. & weitere (1996).** Life with 6000 Genes. *Science* **274**, 546–567.
- Golemis, E. A. & Brent, R. (1992).** Fused protein domains inhibit DNA binding by LexA. *Mol Cell Biol* **12**, 3006–3014.
- Goulev, Y., Fauny, J. D., Gonzalez-Marti, B., Flagiello, D., Silber, J. & Zider, A. (2008).** Scalloped interacts with Yorkie, the nuclear effector of the hippo tumor-suppressor pathway in *Drosophila*. *Curr Biol* **18**, 435–441.
- Guarente, L. & Ptashne, M. (1981).** Fusion of *Escherichia coli lacZ* to the cytochrome *c* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**, 2199–2203.
- Guo, B., Styles, C. a, Feng, Q. & Fink, G. R. (2000).** A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 12158–12163.
- Görner, W., Durchschlag, E., Martinez-Pastor, M. T., Estruch, F., Ammerer, G., Hamilton, B., Ruis, H. & Schüller, C. (1998).** Nuclear localization of the C₂H₂ zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes & Dev* **12**, 586–597.
- Hackett, E. a, Esch, R. K., Maleri, S. & Errede, B. (2006).** A family of destabilized cyan fluorescent proteins as transcriptional reporters in *S. cerevisiae*. *Yeast* **23**, 333–349.
- Hadwiger, J. A., Wittenberg, C., Richardson, H. E., De Barros Lopes, M. & Reed, S. I. (1989).** A family of cyclin homologs that control the G1 phase in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 6255–6259.
- Hagen, D. C., Mc Caffrey, G. & Sprague, G. F. (1991).** Pheromone response elements are necessary and sufficient for basal and pheromone-induced transcription of the *FUS1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **11**, 2952–2961.
- Hahn, J.-S., Hu, Z., Thiele, D. J. & Iyer, V. R. (2004).** Genome-wide analysis of the biology of stress responses through heat shock transcription factor. *Mol Cell Biol* **24**, 5249–5256.
- Hahn, S. & Young, E. T. (2011).** Transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: transcription factor regulation and function, mechanisms of initiation, and roles of activators and coactivators. *Genetics* **189**, 705–736.
- Halder, G., Polaczyk, P., Kraus, M. E., Hudson, A., Kim, J., Laughon, A. & Carroll, S. (1998).** The Vestigial and Scalloped proteins act together to directly regulate wing-specific gene expression in *Drosophila*. *Genes & Dev* **12**, 3900–3909.
- Halme, A., Bumgarner, S., Styles, C. & Fink, G. R. (2004).** Genetic and epigenetic regulation of the *FLO* gene family generates cell-surface variation in yeast. *Cell* **116**, 405–415.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557–580.
- Harbison, C. T., Gordon, D. B., Lee, T. I., Rinaldi, N. J., MacIsaac, K. D., Danford, T. W., Hannett, N. M., Tagne, J.-B., Reynolds, D. B. & weitere (2004).** Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome. *Nature* **431**, 99–104.

- Hartwell, L. H. & Unger, M. W. (1977).** Unequal division in *Saccharomyces cerevisiae* and its implications for the control of cell division. *J Cell Biol* **75**, 422–35.
- Hartwell, L. H., Culotti, J., Pringle, J. R. & Reid, B. J. (1974).** Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science* **183**, 46–51.
- Harvey, S. L. & Kellogg, D. R. (2003).** Conservation of mechanisms controlling entry into mitosis. *Curr Biol* **13**, 264–275.
- Heiman, M. G. & Walter, P. (2000).** Prm1p, a pheromone-regulated multispanning membrane protein, facilitates plasma membrane fusion during yeast mating. *J Cell Biol* **151**, 719–730.
- Heise, B., van der Felden, J., Kern, S., Malcher, M., Brückner, S. & Mösch, H.-U. (2010).** The TEA transcription factor Tec1 confers promoter-specific gene regulation by Ste12-dependent and -independent mechanisms. *Eukaryot Cell* **9**, 514–531.
- Heitman, J., Movva, N. & Hall, M. (1991).** Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* **253**, 905–909.
- Herskowitz, I. (1988).** Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **52**, 536–553.
- Hess, S. M., Stanford, D. R. & Hopper, A. K. (1994).** *SRD1*, a *S. cerevisiae* gene affecting pre-rRNA processing contains a C₂/C₂ zinc finger motif. *Nucleic Acids Res* **22**, 1265–1271.
- Hilman, D. & Gat, U. (2011).** The evolutionary history of YAP and the hippo/YAP pathway. *Mol Biol Evol* **28**, 2403–2417.
- Hinnebusch, A. G. (1992).** General and pathway-specific regulatory mechanisms controlling the synthesis of amino acid biosynthetic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. In *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces: Gene expression*, pp. 319–414. Edited by E. W. Jones, J. R. Pringle & J. R. Broach. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Hinnebusch, A. G. (1997).** Translational regulation of yeast *GCN4*. *J Biol Chem* **272**, 21661–21664.
- Hinnebusch, A. G. (2005).** Translational regulation of *GCN4* and the general amino acid control of yeast. *Annu Rev Microbiol* **59**, 407–450.
- Hoffman, C. S. & Winston, F. (1987).** A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**, 267–272.
- Hoi, J. W. S. & Dumas, B. (2010).** Ste12 and Ste12-like proteins, fungal transcription factors regulating development and pathogenicity. *Eukaryot Cell* **9**, 480–485.
- Holmes, D. S. & Quigley, M. (1981).** A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* **114**, 193–197.
- Hsu, D. K. W., Guo, Y., Alberts, G. F., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Peifley, K. A. & Winkles, J. A. (1996).** Identification of a murine *TEF-1*-related gene expressed after mitogenic stimulation of quiescent fibroblasts and during myogenic differentiation. *J Biol Chem* **271**, 13786–13795.
- Huang, J., Wu, S., Barrera, J., Matthews, K. & Pan, D. (2005).** The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the *Drosophila* Homolog of YAP. *Cell* **122**, 421–434.

- Hung, W., Olson, K. A., Breikreutz, A. & Sadowski, I. (1997).** Characterization of the basal and pheromone-stimulated phosphorylation states of Ste12p. *Eur J Biochem* **245**, 241–251.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. & Kimura, A. (1983).** Transformation of intact yeast cells treated with alkali. *J Bacteriol* **153**, 163–168.
- Iyer, V. R., Horak, C. E., Scafe, C. S., Botstein, D., Snyder, M. & Brown, P. O. (2001).** Genomic binding sites of the yeast cell-cycle transcription factors SBF and MBF. *Nature* **409**, 533–538.
- Jacquemin, P., Hwang, J.-J., Martial, J. A., Dollé, P. & Davidson, I. (1996).** A novel family of developmentally regulated mammalian transcription factors containing the TEA/ATTS DNA Binding Domain. *J Biol Chem* **271**, 21775–21785.
- Janke, C., Magiera, M. M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E. & weitere (2004).** A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* **21**, 947–962.
- Jansen, G., Wu, C., Schade, B., Thomas, D. Y. & Whiteway, M. (2005).** Drag&Drop cloning in yeast. *Gene* **344**, 43–51.
- Jiang, S.-W., Wu, K. & Eberhardt, N. L. (1999).** Human placental TEF-5 transactivates the human chorionic somatomammotropin gene enhancer. *Mol Endocrinol* **13**, 879–889.
- Johnson, P. R., Swanson, R., Rakhilina, L. & Hochstrasser, M. (1998).** Degradation signal masking by heterodimerization of MAT α 2 and MAT α 1 blocks their mutual destruction by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* **94**, 217–227.
- Johnston, G. C., Pringle, J. R. & Hartwell, L. H. (1977).** Coordination of growth with cell division in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Exp Cell Res* **105**, 79–98.
- Jorgensen, P. & Tyers, M. (2004).** How cells coordinate growth and division. *Curr Biol* **14**, 1014–1027.
- Jorgensen, P., Nishikawa, J. L., Breikreutz, B.-J. & Tyers, M. (2002).** Systematic identification of pathways that couple cell growth and division in yeast. *Science* **297**, 395–400.
- Jorgensen, P., Rupes, I., Sharom, J. R., Schnepher, L., Broach, J. R. & Tyers, M. (2004).** A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size. *Genes & Dev* **18**, 2491–2505.
- Jungbluth, M., Renicke, C. & Taxis, C. (2010).** Targeted protein depletion in *Saccharomyces cerevisiae* by activation of a bidirectional degron. *BMC Syst Biol* **4**, 176.
- Kern, S. (2011).** Kernimport des TEAD-Transkriptionsfaktors Tec1 aus *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation. *Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg*.
- Kim, J. H. & Powers, S. (1991).** Overexpression of *RP11*, a novel inhibitor of the yeast Ras-cyclic AMP pathway, down-regulates normal but not mutationally activated Ras function. *Mol Cell Biol* **11**, 3894–3904.
- Kirkman-Correia, C., Stroke, I. L. & Fields, S. (1993).** Functional domains of the yeast STE12 protein, a pheromone-responsive transcriptional activator. *Mol Cell Biol* **13**, 3765–3772.
- Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K. & Schiebel, E. (1999).** Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* **15**, 963–972.

- Koch, C., Moll, T., Neuberg, M., Ahorn, H. & Nasmyth, K. (1993).** A role for the transcription factors Mbp1 and Swi4 in progression from G1 to S phase. *Science* **261**, 1551–1557.
- Kojic, E. M. & Darouiche, R. O. (2004).** *Candida* Infections of Medical Devices. *Clin Microbiol Rev* **17**, 255–267.
- Kostriken, R., Strathern, J. N., Klar, A. J., Hicks, J. B. & Heffron, F. (1983).** A site-specific endonuclease essential for mating-type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* **35**, 167–174.
- Kosugi, S., Hasebe, M., Tomita, M. & Yanagawa, H. (2009).** Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 10171–10176.
- Kraakman, L., Lemaire, K., Ma, P., Teunissen, A. W. R. H., Donaton, M. C. V., Van Dijck, P., Winderickx, J., de Winde, J. H. & Thevelein, J. M. (1999).** A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Mol Microbiol* **32**, 1002–1012.
- Krogan, N. J., Cagney, G., Yu, H., Zhong, G., Guo, X., Ignatchenko, A., Li, J., Pu, S., Datta, N. & weitere (2006).** Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **440**, 637–643.
- Kron, S. J., Styles, C. A. & Fink, G. R. (1994).** Symmetric cell division in pseudohyphae of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **5**, 1003–1022.
- Kuchin, S., Vyas, V. K. & Carlson, M. (2002).** Snf1 protein kinase and the repressors Nrg1 and Nrg2 regulate *FLO11*, haploid invasive growth, and diploid pseudohyphal differentiation. *Mol Cell Biol* **22**, 3994–4000.
- Kumar, R., Reynolds, D. M., Shevchenko, A., Shevchenko, A., Goldstone, S. D. & Dalton, S. (2000).** Forkhead transcription factors, Fkh1p and Fkh2p, collaborate with Mcm1p to control transcription required for M-phase. *Curr Biol* **10**, 896–906.
- Kupiec, M., Byers, B., Esposito, R. E. & Mitchell, A. P. (1997).** Meiosis and sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. In *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces: Cell cycle and cell biology*, pp. 889–1036. Edited by J. R. Pringle, J. R. Broach & E. W. Jones. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Köhler, T., Wesche, S., Taheri, N. & Braus, G. H. (2002).** Dual role of the *Saccharomyces cerevisiae* TEA/ATTS family transcription factor Tec1p in regulation of gene expression and cellular development. *Eukaryot Cell* **1**, 673–686.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Laloux, I., Jacobs, E. & Dubois, E. (1994).** Involvement of SRE element of Tyl1 transposon in TEC1-dependent transcriptional activation. *Nucleic Acids Res* **22**, 999–1005.
- Laloux, I., Dubois, E., Dewerchin, M. & Jacobst, E. (1990).** *TEC1*, a gene involved in the activation of Tyl and Tyl-mediated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*: cloning and molecular analysis. *Mol Cell Biol* **10**, 3541–3550.
- Lempiäinen, H. & Shore, D. (2009).** Growth control and ribosome biogenesis. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 855–863.

- Leslie, D. M., Grill, B., Rout, M. P., Richard, W., Aitchison, J. D. & Wozniak, R. W. (2002). Kap121p-mediated nuclear import is required for mating and cellular differentiation in yeast. *Mol Cell Biol* **22**, 2544–2555.
- Li, J., Tetzlaff, M. T. & Elledge, S. J. (2008). Identification of *MSA1*, a cell cycle-regulated, dosage suppressor of *drc1/sld2* and *dpb11* mutants. *Cell Cycle* **7**, 3388–3398.
- Lieb, J. D., Liu, X., Botstein, D. & Brown, P. O. (2001). Promoter-specific binding of Rap1 revealed by genome-wide maps of protein-DNA association. *Nature Genet* **28**, 327–334.
- Liu, H., Styles, C. A. & Fink, G. R. (1993). Elements of the yeast pheromone response pathway required for filamentous growth of diploids. *Science* **262**, 1741–1744.
- Lo, H.-J., Köhler, J. R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti & Fink, G. R. (1997). Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* **90**, 939–949.
- Lo, W. S. & Dranginis, A. M. (1998). The cell surface flocculin Flo11 is required for pseudohyphae formation and invasion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **9**, 161–171.
- Lobo, Z. & Maitra, P. K. (1977). Physiological role of glucose-phosphorylating enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys* **182**, 639–645.
- Loeb, J. D. J., Kerentseva, T. A., Pan, T., Sepulveda-Becerra, M. & Liu, H. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* G1 cyclins are differentially involved in invasive and protein kinase pathway. *Genetics* **153**, 1535–1546.
- Loewith, R. & Hall, M. N. (2011). Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. *Genetics* **189**, 1177–1201.
- Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J. L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P. & Hall, M. N. (2002). Two TOR complexes, only one of which is Rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell* **10**, 457–468.
- Lord, P. G. & Wheals, A. E. (1983). Rate of cell cycle initiation of yeast cells when cell size is not a rate-determining factor. *J Cell Sci* **59**, 183–201.
- Lorenz, M. C., Cutler, N. S. & Heitman, J. (2000). Characterization of alcohol-induced filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **11**, 183–99.
- Loy, C. J., Lydall, D. & Surana, U. (1999). *NDD1*, a high-dosage suppressor of *cdc28-1N*, is essential for expression of a subset of late-S-phase-specific genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**, 3312–3327.
- MacIsaac, K. D., Wang, T., Gordon, D. B., Gifford, D. K., Stormo, G. D. & Fraenkel, E. (2006). An improved map of conserved regulatory sites for *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Bioinformatics* **7**, 113.
- Maddock, J. R., Weidenhammer, E. M., Adams, C. C., Lunz, R. L. & Woolford, J. L. (1994). Extragenic suppressors of *Saccharomyces cerevisiae prp4* mutations identify a negative regulator of PRP genes. *Genetics* **136**, 833–847.
- Madhani, H. D. & Fink, G. R. (1997). Combinatorial control required for the specificity of yeast MAPK signaling. *Science* **275**, 1314–1317.

- Madhani, H. D., Galitski, T., Lander, E. S. & Fink, G. R. (1999).** Effectors of a developmental mitogen-activated protein kinase cascade revealed by expression signatures of signaling mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 12530–12535.
- Madhani, H. D., Styles, C. A. & Fink, G. R. (1997).** MAP kinases with distinct inhibitory functions impart signaling specificity during yeast differentiation. *Cell* **91**, 673–684.
- Mandel, M. & Higa, A. (1970).** Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* **53**, 159–163.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J. (1982).** Molecular cloning : A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Mar, J. H. & Ordahl, C. P. (1988).** A conserved *CATTCT* motif is required for skeletal muscle-specific activity of the cardiac troponin T gene promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 6404–6408.
- Mar, J. H. & Ordahl, C. P. (1990).** M-CAT binding factor, a novel trans-acting factor governing muscle-specific transcription. *Mol Cell Biol* **10**, 4271–4283.
- Marion, R. M., Regev, A., Segal, E., Barash, Y., Koller, D., Friedman, N. & O’Shea, E. K. (2004).** Sfp1 is a stress- and nutrient-sensitive regulator of ribosomal protein gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 14315–14322.
- Martin, D. E., Soulard, A. & Hall, M. N. (2004).** TOR regulates ribosomal protein gene expression via PKA and the Forkhead transcription factor FHL1. *Cell* **119**, 969–979.
- Martínez-Pastor, M. T., Marchler, G., Schüller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H. & Estruch, F. (1996).** The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J* **15**, 2227–35.
- Matheos, D., Metodiev, M., Muller, E., Stone, D. & Rose, M. D. (2004).** Pheromone-induced polarization is dependent on the Fus3p MAPK acting through the formin Bni1p. *J Cell Biol* **165**, 99–109.
- Mauviel, A., Nallet-Staub, F. & Varelas, X. (2012).** Integrating developmental signals: a Hippo in the (path)way. *Oncogene* **31**, 1743–1756.
- Mendizabal, I., Rios, G., Mulet, J. M., Serrano, R. & de Larrinoa, I. F. (1998).** Yeast putative transcription factors involved in salt tolerance. *FEBS Lett* **425**, 323–328.
- Merzlyak, E. M., Goedhart, J., Shcherbo, D., Bulina, M. E., Shcheglov, A. S., Fradkov, A. F., Gaintzeva, A., Lukyanov, K. A., Lukyanov, S. & weitere (2007).** Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. *Nature Methods* **4**, 555–557.
- Mirabito, P. M., Adams, T. H. & Timberlake, W. E. (1989).** Interactions of three sequentially expressed genes control temporal and spatial specificity in *Aspergillus* development. *Cell* **57**, 859–868.
- Monteiro, G. & Netto, L. E. S. (2004).** Glucose repression of *PRX1* expression is mediated by Tor1p and Ras2p through inhibition of Msn2/4p in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* **241**, 221–228.
- Morris, R. T., O’Connor, T. R. & Wyrick, J. J. (2010).** Ceres: software for the integrated analysis of transcription factor binding sites and nucleosome positions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioinformatics* **26**, 168–174.

- Myers, A. M., Tzagoloff, A., Kinney, D. M. & Lusty, C. J. (1986). Yeast shuttle and integrative vectors with multiple cloning sites suitable for construction of *lacZ* fusions. *Gene* **45**, 299–310.
- Mösch, H. U., Roberts, R. L. & Fink, G. R. (1996). Ras2 signals via the Cdc42/Ste20/mitogen-activated protein kinase module to induce filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 5352–5356.
- Mösch, H. U., Kübler, E., Krappmann, S., Fink, G. R. & Braus, G. H. (1999). Crosstalk between the Ras2p-controlled mitogen-activated protein kinase and cAMP pathways during invasive growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **10**, 1325–1335.
- Mösch, H.-U. & Fink, G. R. (1997). Dissection of filamentous growth by transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* **4272–4284**.
- Nagai, T., Ibata, K., Park, E. S., Kubota, M., Mikoshiba, K. & Miyawaki, A. (2002). A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nature Biotechnol* **20**, 87–90.
- Nash, R., Tokiwa, G., Anand, S., Erickson, K. & Futcher, A. B. (1988). The *WHI1*⁺ gene of *Saccharomyces cerevisiae* tethers cell division to cell size and is a cyclin homolog. *EMBO J* **7**, 4335–4346.
- Natarajan, K., Meyer, M. R., Jackson, B. M., Slade, D., Roberts, C., Hinnebusch, A. G. & Marton, M. J. (2001). Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol Cell Biol* **21**, 4347–4368.
- Nurse, P. (1975). Genetic control of cell size at division in yeast. *Nature* **256**, 547–551.
- Oehlen, L. & Cross, F. (1998). The mating factor response pathway regulates transcription of *TEC1*, a gene involved in pseudohyphal differentiation of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **429**, 83–88.
- Olson, K. A., Nelson, C., Tai, G., Hung, W., Yong, C., Astell, C. & Sadowski, I. (2000). Two regulators of Ste12p inhibit pheromone-responsive transcription by separate mechanisms. *Mol Cell Biol* **20**, 4199–4209.
- Palecek, S. P., Parikh, A. S., Huh, J. H. & Kron, S. J. (2002). Depression of *Saccharomyces cerevisiae* invasive growth on non-glucose carbon sources requires the Snf1 kinase. *Mol Microbiol* **45**, 453–469.
- Pan, X. & Heitman, J. (1999). Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**, 4874–4887.
- Paumard-Rigal, S., Zider, A., Vaudin, P. & Silber, J. (1998). Specific interactions between vestigial and scalloped are required to promote wing tissue proliferation in *Drosophila melanogaster*. *Dev Genes Evol* **208**, 440–446.
- Peter, M. & Herskowitz, I. (1994). Direct inhibition of the yeast cyclin-dependent kinase Cdc28-Cln by Far1. *Science* **265**, 1228–1231.
- Pi, H., Chien, C. T. & Fields, S. (1997). Transcriptional activation upon pheromone stimulation mediated by a small domain of *Saccharomyces cerevisiae* Ste12p. *Mol Cell Biol* **17**, 6410–6418.
- Pobbati, A. V., Chan, S. W., Lee, I., Song, H. & Hong, W. (2012). Structural and functional similarity between the Vgll1-TEAD and the YAP-TEAD complexes. *Structure* **20**, 1135–1140.

- Pramila, T., Wu, W., Miles, S., Noble, W. S. & Breeden, L. L. (2006).** The Forkhead transcription factor Hcm1 regulates chromosome segregation genes and fills the S-phase gap in the transcriptional circuitry of the cell cycle. *Genes & Dev* **20**, 2266–2278.
- Primig, M., Winkler, H. & Ammerer, G. (1991).** The DNA binding and oligomerization domain of MCM1 is sufficient for its interaction with other regulatory proteins. *EMBO J* **10**, 4209–4218.
- Pringle, J. R. & Hartwell, L. H. (1981).** The *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. In *The molecular biology of the yeast Saccharomyces Life cycle and inheritance*, pp. 97–142. Edited by J. N. Strathern, E. W. Jones & J. R. Broach. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Prinz, S., Aldridge, C., Ramsey, S. A., Taylor, R. J. & Galitski, T. (2007).** Control of signaling in a MAP-kinase pathway by an RNA-binding protein. *PLoS ONE* **2**, e249.
- Ramezani Rad, M., Jansen, G., Bühring, F. & Hollenberg, C. P. (1998).** Ste50p is involved in regulating filamentous growth in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and associates with Ste11p. *MGG* **259**, 29–38.
- Reynolds, T. B. & Fink, G. R. (2001).** Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science* **291**, 878–881.
- Rispail, N. & Di Pietro, A. (2010).** The homeodomain transcription factor Ste12 connecting fungal MAPK signalling to plant pathogenicity. *Commun Integr Biol* **3**, 327–332.
- Roberts, C. J., Nelson, B., Marton, M. J., Stoughton, R., Meyer, M. R., Bennett, H. A., He, Y. D., Dai, H., Walker, W. L. & weitere (2000).** Signaling and circuitry of multiple MAPK pathways revealed by a matrix of global gene expression profiles. *Science* **287**, 873–880.
- Roberts, R. L. & Fink, G. R. (1994).** Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes & Dev* **8**, 2974–2985.
- Roberts, R. L., Mösch, H.-U. & Fink, G. R. (1997).** 14-3-3 proteins are essential for RAS/MAPK cascade signaling during pseudohyphal development in *S. cerevisiae*. *Cell* **89**, 1055–1065.
- Robertson, L. S., Causton, H. C., Young, R. A. & Fink, G. R. (2000).** The yeast A kinases differentially regulate iron uptake and respiratory function. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 5984–5988.
- Robertson, L. S. & Fink, G. R. (1998).** The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 13783–13787.
- Robzyk, K. & Kassir, Y. (1992).** A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast. *Nucleic Acids Res* **20**, 3790.
- Rohde, J. R., Bastidas, R., Puria, R. & Cardenas, M. E. (2008).** Nutritional control via Tor signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Microbiol* **11**, 153–160.
- Rose, M. & Botstein, D. (1983).** Construction and use of gene fusions to *lacZ* (beta-galactosidase) that are expressed in yeast. *Methods Enzymol* **101**, 167–180.
- Roy, A., Lu, C. F., Marykwas, D. L., Lipke, P. N. & Kurjan, J. (1991).** The *AGA1* product is involved in cell surface attachment of the *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion glycoprotein a-agglutinin. *Mol Cell Biol* **11**, 4196–4206.

- Rupp, S., Summers, E., Lo, H. J., Madhani, H. & Fink, G. (1999).** MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast *FLO11* gene. *EMBO J* **18**, 1257–1269.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. & Arnheim, N. (1985).** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350–1354.
- Schlenstedt, G., Saavedra, C., Loeb, J. D., Cole, C. N. & Silver, P. A. (1995).** The GTP-bound form of the yeast Ran/TC4 homologue blocks nuclear protein import and appearance of poly(A)⁺ RNA in the cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 225–229.
- Schmidt, A., Kunz, J. & Hall, M. N. (1996).** TOR2 is required for organization of the actin cytoskeleton in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 13780–13785.
- Schneider, B. L., Zhang, J., Markwardt, J., Volpe, T., Honey, S., Futcher, B. & Tokiwa, G. (2004).** Growth rate and cell size modulate the synthesis of, and requirement for, G1-phase cyclins at start. *Mol Cell Biol* **24**, 10802–10813.
- Schweizer, A., Rupp, S., Taylor, B. N., Rölinghoff, M. & Schröppel, K. (2000).** The TEA/ATTS transcription factor CaTec1p regulates hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **38**, 435–445.
- Shamji, A. F., Kuruvilla, F. G. & Schreiber, S. L. (2000).** Partitioning the transcriptional program induced by rapamycin among the effectors of the Tor proteins. *Curr Biol* **10**, 1574–1581.
- Sherman, F., Fink, G. R. & Hicks, J. B. (1986).** Laboratory course manual for methods in yeast genetics. In *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Sikorski, R. S. & Hieter, P. (1989).** A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**, 19–27.
- Simmonds, A. J., Liu, X., Soanes, K. H., Krause, H. M., Irvine, K. D. & Bell, J. B. (1998).** Molecular interactions between Vestigial and Scalloped promote wing formation in *Drosophila*. *Genes & Dev* **12**, 3815–3820.
- Singh, J. & Tyers, M. (2009).** A Rab escort protein integrates the secretion system with TOR signaling and ribosome biogenesis. *Genes & Dev* **23**, 1944–1958.
- Smets, B., Ghillebert, R., De Snijder, P., Binda, M., Swinnen, E., De Virgilio, C. & Winderickx, J. (2010).** Life in the midst of scarcity: adaptations to nutrient availability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **56**, 1–32.
- Sobering, A. K., Jung, U. S., Lee, K. S. & Levin, D. E. (2002).** Yeast Rpi1 is a putative transcriptional regulator that contributes to preparation for stationary phase. *Eukaryot Cell* **1**, 56–65.
- Sollner, S., Schober, M., Wagner, A., Prem, A., Lorkova, L., Palfey, B. A., Groll, M. & Macheroux, P. (2009).** Quinone reductase acts as a redox switch of the 20S yeast proteasome. *EMBO Reports* **10**, 65–70.
- Southern, E. M. (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503–517.
- Spellman, P. T., Sherlock, G., Zhang, M. Q., Iyer, V. R., Anders, K., Eisen, M. B., Brown, P. O., Botstein, D. & Futcher, B. (1998).** Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol Biol Cell* **9**, 3273–3297.

- Sprague, G. F., Blair, L. C. & Thorner, J. (1983).** Cell interactions and regulation of cell type in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Microbiol* **37**, 623–630.
- Su, T.-C., Tamarkina, E. & Sadowski, I. (2010).** Organizational constraints on Ste12 cis-elements for a pheromone response in *Saccharomyces cerevisiae*. *The FEBS journal* **277**, 3235–3248.
- Tamaki, H. (2007).** Glucose-stimulated cAMP-protein kinase A pathway in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng* **104**, 245–250.
- Tedford, K., Kim, S., Sa, D., Stevens, K. & Tyers, M. (1997).** Regulation of the mating pheromone and invasive growth responses in yeast by two MAP kinase substrates. *Curr Biol* **7**, 228–238.
- Teixeira, M. C., Monteiro, P., Jain, P., Tenreiro, S., Fernandes, A. R., Mira, N. P., Alenquer, M., Freitas, A. T., Oliveira, A. L. & Sá-Correia, I. (2006).** The YEASTRACT database: a tool for the analysis of transcription regulatory associations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **34**, 446–451.
- Tesfaigzi, J., Smith-Harrison, W. & Carlson, D. M. (1994).** A simple method for reusing western blots on PVDF membranes. *Biotechniques* **17**, 268–269.
- Thevelein, J. M., Geladé, R., Holsbeeks, I., Lagatie, O., Popova, Y., Rolland, F., Stolz, F., Van de Velde, S., Van Dijck, P. & weitere (2005).** Nutrient sensing systems for rapid activation of the protein kinase A pathway in yeast. *Biochem Soc Trans* **33**, 253–256.
- Thevelein, J. M. & de Winde, J. H. (1999).** Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **33**, 904–918.
- Titz, B., Thomas, S., Rajagopala, S. V., Chiba, T., Ito, T. & Uetz, P. (2006).** Transcriptional activators in yeast. *Nucleic Acids Res* **34**, 955–967.
- Toda, T., Uno, I., Ishikawa, T., Powers, S., Kataoka, T., Broek, D., Cameron, S., Broach, J., Matsumoto, K. & Wigler, M. (1985).** In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase. *Cell* **40**, 27–36.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 4350–4354.
- Toyn, J. H. & Johnston, L. H. (1994).** The Dbf2 and Dbf20 protein kinases of budding yeast are activated after the metaphase to anaphase cell cycle transition. *EMBO J* **13**, 1103–13.
- Treger, J. M. & McEntee, K. (1990).** Structure of the DNA damage-inducible gene *DDR48* and evidence for its role in mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **10**, 3174–3184.
- Trueheart, J., Boeke, J. E. F. D. & Fink, G. R. (1987).** Two genes required for cell fusion during yeast conjugation: evidence for a pheromone-induced surface protein. *Mol Cell Biol* **7**, 2316–2328.
- Turner, J. J., Ewald, J. C. & Skotheim, J. M. (2012).** Cell size control in yeast. *Curr Biol* **22**, 350–359.
- Tye, B. K. (1999).** MCM proteins in DNA replication. *Ann Rev Biochem* **68**, 649–686.
- Übersax, J. A., Woodbury, E. L., Quang, P. N., Paraz, M., Blethrow, J. D., Shah, K., Shokat, K. M. & Morgan, D. O. (2003).** Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature* **425**, 859–864.

- Urban, J., Soulard, A., Huber, A., Lippman, S., Mukhopadhyay, D., Deloche, O., Wanke, V., Anrather, D., Ammerer, G. & weitere (2007). Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* **26**, 663–674.
- Vadaie, N., Dionne, H., Akajagbor, D. S., Nickerson, S. R., Krysan, D. J. & Cullen, P. J. (2008). Cleavage of the signaling mucin Msb2 by the aspartyl protease Yps1 is required for MAPK activation in yeast. *J Cell Biol* **181**, 1073–1081.
- Varelas, X. & Wrana, J. L. (2012). Coordinating developmental signaling: novel roles for the Hippo pathway. *Trends Cell Biol* **22**, 88–96.
- Vinod, P. K., Sengupta, N., Bhat, P. J. & Venkatesh, K. V. (2008). Integration of global signaling pathways, cAMP-PKA, MAPK and TOR in the regulation of *FLO11*. *PLoS ONE* **3**, e1663
- De Virgilio, C. & Loewith, R. (2006). The TOR signalling network from yeast to man. *Int J Biochem Cell Biol* **38**, 1476–1481.
- Wang, Y. & Dohlman, H. G. (2006). Pheromone-regulated sumoylation of transcription factors that mediate the invasive to mating developmental switch in yeast. *J Biol Chem* **281**, 1964–1969.
- Wang, Y., Abu Irqeba, A., Ayalew, M. & Suntay, K. (2009). Sumoylation of transcription factor Tec1 regulates signaling of mitogen-activated protein kinase pathways in yeast. *PLoS ONE* **4**, e7456.
- Warner, J. R., Vilardell, J. & Sohn, J. H. (2001). Economics of ribosome biosynthesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **66**, 567–574.
- Weiner, M. P., Costa, G. L., Schoettlin, W., Cline, J., Mathur, E. & Bauer, J. C. (1994). Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene* **151**, 119–123.
- Weisser, S. (2009). *In vivo* Quantifizierung der Fus3/Kss1-MAPK-Modul-Aktivität in *Saccharomyces cerevisiae*. Bachelorarbeit. *Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg*.
- Weisser, S. (2011). Analysis of the signal processing dynamics by the Fus3/Kss1-MAPK module in *Saccharomyces cerevisiae*. Masterarbeit. *Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg*.
- White, M. A., Riles, L. & Cohen, B. A. (2009). A systematic screen for transcriptional regulators of the yeast cell cycle. *Genetics* **181**, 435–446.
- Wittenberg, C. & Reed, S. I. (2005). Cell cycle-dependent transcription in yeast: promoters, transcription factors, and transcriptomes. *Oncogene* **24**, 2746–2755.
- Wittenberg, C., Sugimoto, K. & Reed, S. I. (1990). G1-specific cyclins of *S. cerevisiae*: cell cycle periodicity, regulation by mating pheromone, and association with the p34^{CDC28} protein kinase. *Cell* **62**, 225–237.
- Wolfner, M., Yep, D., Messenguy, F. & Fink, G. R. (1975). Integration of amino acid biosynthesis into the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* **96**, 273–290.
- Wu, J., Duggan, A. & Chalfie, M. (2001). Inhibition of touch cell fate by *egl-44* and *egl-46* in *C. elegans*. *Genes & Dev* **15**, 789–802.
- Wu, W.-S. & Li, W.-H. (2008). Systematic identification of yeast cell cycle transcription factors using multiple data sources. *BMC Bioinformatics* **9**, 522.
- Xiao, J. H., Davidson, I., Matthes, H., Garnier, J.-M. & Chambon, P. (1991). Cloning, expression, and transcriptional properties of the human enhancer factor *TEF-I*. *Cell* **65**, 551–568.

- Yaffe, M. P. & Schatz, G. (1984).** Two nuclear mutations that block mitochondrial protein import in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**, 4819–4823.
- Yagi, R., Chen, L. F., Shigesada, K., Murakami, Y. & Ito, Y. (1999).** A WW domain-containing yes-associated protein (YAP) is a novel transcriptional co-activator. *EMBO J* **18**, 2551–2562.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985).** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103–119.
- Yao, R., Zhang, Z., An, X., Bucci, B., Perlstein, D. L., Stubbe, J. & Huang, M. (2003).** Subcellular localization of yeast ribonucleotide reductase regulated by the DNA replication and damage checkpoint pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 6628–6633.
- Yao, S., Neiman, A. & Prelich, G. (2000).** *BUR1* and *BUR2* encode a divergent cyclin-dependent kinase-cyclin complex important for transcription *in vivo*. *Mol Cell Biol* **20**, 7080–7087.
- Yuan, Y. L. & Fields, S. (1991).** Properties of the DNA-binding domain of the *Saccharomyces cerevisiae* STE12 protein. *Mol Cell Biol* **11**, 5910–5918.
- Yuan, Y. O., Stroke, I. L. & Fields, S. (1993).** Coupling of cell identity to signal response in yeast: interaction between the alpha 1 and STE12 proteins. *Genes & Dev* **7**, 1584–1597.
- Zaman, S., Lippman, S. I., Zhao, X. & Broach, J. R. (2008).** How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annu Review Genet* **42**, 27–81.
- Zeitlinger, J., Simon, I., Harbison, C. T., Hannett, N. M., Volkert, T. L., Fink, G. R. & Young, R. A. (2003).** Program-specific distribution of a transcription factor dependent on partner transcription factor and MAPK signaling. *Cell* **113**, 395–404.
- Zeng, Q., Qiu, F. & Yuan, L. (2008).** Production of artemisinin by genetically-modified microbes. *Biotechnol Lett* **30**, 581–592.
- Zhang, J., Schneider, C., Ottmers, L., Rodriguez, R., Day, A., Markwardt, J. & Schneider, B. L. (2002).** Genomic scale mutant hunt identifies cell size homeostasis genes in *S. cerevisiae*. *Curr Biol* **12**, 1992–2001.
- Zhao, B., Lei, Q.-Y. & Guan, K.-L. (2008).** The Hippo-YAP pathway: new connections between regulation of organ size and cancer. *Curr Opin Cell Biol* **20**, 638–646.
- Zhao, B., Li, L., Lei, Q. & Guan, K.-L. (2010).** The Hippo-YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: an updated version. *Genes & Dev* **24**, 862–874.
- Zhao, B., Tumaneng, K. & Guan, K.-L. (2011).** The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal. *Nature Cell Biol* **13**, 877–83.
- Zheng, X. F. & Schreiber, S. L. (1997).** Target of rapamycin proteins and their kinase activities are required for meiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 3070–3075.
- Zhu, C., Byers, K. J. R. P., McCord, R. P., Shi, Z., Berger, M. F., Newburger, D. E., Saulrieta, K., Smith, Z., Shah, M. V. & weitere (2009).** High-resolution DNA-binding specificity analysis of yeast transcription factors. *Genome Res* **19**, 556–566.

7 Lebenslauf

Die Seite 165 (Lebenslauf) enthält persönliche Daten. Sie sind deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

8 Danke!

- * Prof. Hans-Ulrich Mösch für die hervorragende Betreuung, wertvolle Anregungen und ein motivierendes Arbeitsumfeld.
- * Prof. Erhard Bremer für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.
- * Prof. Peter Lenz und Prof. Torsten Waldminghaus für ihre Bereitschaft, meiner Prüfungskommission anzugehören.
- * Prof. Peter Lenz außerdem für eine spannende Kooperation.
- * Dr. Stefan Brückner, dafür dass er Msa2 in seiner Diplomarbeit "herausgefischt" hat und für fundierte experimentelle Beratung.
- * Dr. Christof Taxis für viele hilfreiche Tipps rund um Fluoreszenzmikroskopie, genomisches Tagging und allgemeine Laborarbeiten.
- * Sarah W. für die Unterstützung des synmikro-Projekts durch zwei Abschlussarbeiten, ein Praktikum und als Hiwi.
- * Konstanze Bandmann für die Zusammenarbeit und das tolle Programm zur Auswertung der Mikroskopiebilder mittels ImageJ und Excel.
- * Sarah S., Sandra, Marc und Raphael als gute Vorbilder für Laborarbeit und wissenschaftliches Arbeiten.
- * Den beiden Sarahs unterschiedlicher Größe ☺ und der Erfolgsautorin Didi für eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und vielseitige Gesprächsthemen...
- * ...zusammen mit Rike, Nina und Christian für schöne Spieleabende und weitere Aktivitäten.
- * Der AG Bölker für chemische "Leihgaben" und unterhaltsame Mittagspausen.
- * Hanne für die kompromisslose Umsetzung bürokratischer Vorhaben und für die Weihnachtsfeiern in heimeliger Ketzerbachatmosphäre.
- * Den meisten bisher genannten Personen für lustige, ereignisreiche Betriebsausflüge, Konferenzen, Weihnachtsfeiern und Frühstücke.
- * Dem GRK 1216 und der synmikro-Graduiertenschule für interdisziplinäre Vernetzung und nette Bekanntschaften.
- * Meinen "4 Eltern" für gute Grundlagen und dafür dass sie immer für mich da sind.
- * Niki, Sarah W. und Anja fürs Korrekturlesen.
- * Meinen Freunden dafür, dass sie meine Freunde sind.
- * Niki dafür, dass er wunderbar ist.

² RMATTCYY Motive (Heise *et al.*, 2010) in Promotorregionen (1000 bp).
³ Bindung durch Transkriptionsfaktoren (Harbison *et al.*, 2004).
⁴ Saccharomyces Genome Database (www.yeastgenome.org)

² RMATTCYY Motive (Heise *et al.*, 2010) in Promotorregionen (1000 bp).
³ Bindung durch Transkriptionsfaktoren (Harbison *et al.*, 2004).
⁴ Saccharomyces Genome Database (www.yeastgenome.org)

SIT1	YEL065W	-2.2	-1.6	-2.4	-1.4																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															</
------	---------	------	------	------	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----